

SÉRIE A, N° 1769

N° D'ORDRE :

2635

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. A. DEY

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE DU ZINC CHEZ LES ANIMAUX.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 22 DÉC. 1937 *devant la Commission d'examen*

MM. JAVILLIER.	Président.
F. PERRIN	} Examineurs.
AUBEL	

PARIS

IMPRIMERIE J. DUMOULIN

5, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS

1937



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551607_0005

SÉRIE A, n° 1769

N° D'ORDRE :

2635

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

PAR

M. A. DEY

1^{re} THÈSE. — ÉTUDE BIOCHIMIQUE DU ZINC CHEZ LES ANIMAUX.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. JAVILLIER. *Président.*

F. PERRIN

AUBEL } *Examineurs.*

PARIS

IMPRIMERIE J. DUMOULIN

5, RUE DES GRANDS-AUGUSTINS

1937

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, Professeur, Physique du Globe.

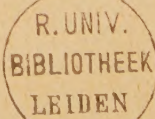
Professeurs honoraires	H. LEBESGUE.	FREUNDLER.	VESSIOT.	Ch. FABRY.
	A. FERNACH.	AUGER.	PORTIER.	Léon BERTRAND.
	Émile PICARD.	BLAISE.	MOLLIARD.	WINTREBERT.
	Léon BRILLOUIN.	DANGEARD.	LAPICQUE.	DUBOSQ.
	GUILLET.	LESPIEAU.	G. BERTRAND.	BOHN.
	PÉCHARD.	MARCHIS.	ABRAHAM.	

PROFESSEURS

M. CAULLERY.	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	FOCH	T	Mécanique expérimentale des fluides
G. URBAIN	T	Chimie générale.	PAUTHENIER.		Physique (P. C. B.).
Émile BOREL.	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	De BROGLIE.	T	Théories physiques.
Jean PERRIN	T	Chimie physique.	CHRÉTIEN		Optique appliquée.
E. CARTAN	T	Géométrie supérieure	J ^e . JOB.		Chimie générale.
A. COTTON	T	Recherches physiques	LABROUSTE		Physique du Globe.
J. DRACH	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées.
Charles PÉREZ	T	Zoologie.	VILLEY.		Mécanique physique et expérimentale.
E. RABAUD	T	Biologie expérimentale.	COMBES	T	Physiologie végétale.
M. GUICHARD.	T	Chimie minérale.	GARNIER.	T	Mathématiques générales.
Paul MONTEL.	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	PÉRÈS		Mécanique théorique des fluides.
L. BLARINGHEM.	T	Botanique.	HACKSPILL.		Chimie (P. C. B.).
G. JULIA	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	LAUGIER.	T	Physiologie générale.
C. MAUGUIN	T	Minéralogie.	TOUSSAINT.		Technique Aéronautique.
A. MICHEL-LÉVY	T	Pétrographie.	M. CURIE		Physique (P. C. B.).
H. BÉNARD	T	Mécanique expérimentale des fluides.	G. RIBAUD.	T	Hautes températures.
A. DENJOY.	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	CHAZY.		Mécanique rationnelle.
L. LUTAUD	T	Géographie physique et géologie dynamique.	GAULT.		Chimie (P. C. B.).
Eugène BLOCH.	T	Physique.	CROZE.		Recherches physiques
G. BRUHAT		Physique.	DUPONT	T	Théories chimiques.
E. DARMOIS	T	Enseignement de Physique.	LANQUINE	T	Géologie structurale géologie appliquée.
A. DEBIERNE	T	Physique Générale et Radioactivité.	VALIRON		Mathématiques générales.
A. DUFOUR	T	Physique (P. C. B.).	BARRABÉ		Géologie structurale géologie appliquée
L. DUNOYER.		Optique appliquée.	MILLOT		Biologie animale (P. C. B.).
A. GUILLIERMOND.	T	Botanique.	F. PERRIN.		Théories physiques.
M. JAVILLIER	T	Chimie biologique.	VAYON.		Chimie organique.
L. JOLEAUD	T	Paléontologie.	G. DARMOIS		Calcul des probabilités et physique-mathématique.
ROBERT-LÉVY	T	Physiologie comparée.	CHATTON	T	Biologie maritime.
F. PIÉARD.	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés)	AUREL		Chimie biologique.
Henri VILLAT.	T	Mécanique des fluides et applications.	Jacques BOURCART		Géographie physique et Géologie dynamique.
Ch. JACOB.	T	Géologie.	M ^{me} JOLIO-CURIE		Physique générale et Radioactivité.
P. PASCAL.	T	Chimie minérale.	PLANTEFOL		Biologie végétale (P. C. B.).
M. FRÉCHET.	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.	CABANNES		Enseignement de physique.
E. ESCLANGON.	T	Astronomie.	GRASSÉ		Biologie animale (P. C. B.).
M ^{me} RAMART LUCAS	T	Chimie organique.	PRÉVOST.		Chimie (P. C. B.).
H. BÉGIN.	T	Mécanique physique et expérimentale.			

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire. D. TOMBECK.



A MON MAITRE
MONSIEUR LE PROFESSEUR GABRIEL BERTRAND

Membre de l'Académie des Sciences;
Membre de l'Académie d'Agriculture;
Membre de l'Académie de Médecine;
Professeur à la Faculté des Sciences;
Chef de Service à l'Institut Pasteur.

*En témoignage de ma reconnaissance et de mon
respectueux attachement.*

(Les travaux décrits dans cette thèse ont été faits dans le Laboratoire
de Biochimie à l'Institut Pasteur.)

INTRODUCTION

Pendant longtemps on a admis que le monde vivant était constitué par du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène, de l'azote, du phosphore, du soufre, du chlore, ainsi que des métaux, potassium, sodium, calcium et magnésium. De temps en temps on a signalé la présence de quelques autres métaux, comme le zinc, le manganèse, etc., dans les tissus vivants, en quantités relativement petites, mais leur présence dans les tissus était considérée comme plus ou moins accidentelle.

En 1896, G. Bertrand ⁽¹⁾ a publié un mémoire indiquant pour la première fois le rôle important que ces éléments, présents dans les tissus en très petites quantités seulement, pouvaient jouer dans les processus physiologiques. Il a montré que le fonctionnement de la laccase est en relation avec la présence d'une petite quantité de manganèse. Ainsi a commencé un nouveau chapitre de la science biologique.

Depuis cette découverte, de nombreux travaux ont été effectués pour déterminer le rôle physiologique de plusieurs autres métaux dans le monde vivant.

C'est ainsi que, en ce qui concerne le zinc, étudié spécialement dans le présent travail en se plaçant au point de vue de la physiologie animale, G. Bertrand, d'abord en collaboration avec Benzon ⁽²⁾, puis avec Nakamura ^(2b) et ensuite avec Bhattacharya ⁽³⁾, a montré que le zinc est un élément essentiel pour la croissance des souris blanches.

J'ai pensé qu'il serait utile de savoir si d'autres animaux manifestent également ce besoin en zinc. Dans ce but j'ai choisi le pigeon. Tout d'abord j'ai essayé de me rendre compte de l'action du zinc sur la croissance de ces animaux.

J'ai trouvé que ces oiseaux ont aussi besoin de cet élément pour leur nutrition normale. D'autre part, il est ressorti de ces nouvelles recherches que l'absence du zinc dans le régime alimentaire modifie beaucoup l'influence de la vitamine B¹. G. Bertrand et Bhattacharya ⁽³⁾ ont déjà constaté que les vitamines, ou tout au moins l'une d'entre elles, n'agit pas sur les souris en l'absence complète de zinc.

J'ai été conduit ainsi à porter mon attention sur l'influence exercée par le zinc sur le métabolisme glucidique et sur la respiration des tissus avitaminosés.

J'ai réussi à vérifier que le zinc augmente la respiration des tissus avitaminosés en présence de la vitamine B¹ cristallisée et de l'acide lactique et de l'acide pyruvique, et que l'oxydation de ce dernier acide est également augmentée en présence de cet élément. Ces faits montrent que l'action de la vitamine B¹ est étroitement liée à la présence du zinc.

Enfin, en continuant les expériences, j'ai cherché quelle est l'influence de ce métal sur la respiration et la glycolyse de quelques tissus ordinaires et, cela, dans le but de trouver une explication de la nature et du rôle physiologique de ce métal dans les tissus.

L'exposé de mes recherches est divisé en sept parties :

I. — APERÇU HISTORIQUE.

II. — CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.

1. Technique de dosage du zinc;
2. Technique de dosage de la vitamine B¹;
3. Régime alimentaire;
4. Vitamines :
 - a) Huile de foie de morue purifiée.
 - b) Préparation d'un extrait de vitamine du lait.
 - c) Extrait de foie.
 - d) Extrait de levure.
 - e) Préparation de la vitamine B¹ cristallisée.

III. — ÉLIMINATION DU ZINC.

IV. — ZINC ET CROISSANCE DU PIGEON.

V. — INFLUENCE COMBINÉE DU ZINC ET DE LA VITAMINE B¹ SUR LA RESPIRATION ET SUR LE MÉTABOLISME DES GLUCIDES DES TISSUS.

VI. — INFLUENCE DU ZINC SEUL SUR LA RESPIRATION ET LA GLYCOLYSE DES TISSUS.

VII. — CONCLUSIONS.

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, je voudrais dire ma reconnaissance à tous ceux qui m'aidèrent.

M. le professeur Gabriel Bertrand m'a accueilli dans son labo-

ratoire en 1935 avec la plus grande obligeance. Qu'il me permette de lui dire quelle gratitude je lui dois et quelle reconnaissance je lui garderai pour ses conseils, son enseignement et son inépuisable bienveillance à mon égard.

Je tiens également à remercier M. le professeur Javillier, membre de l'Institut, d'avoir bien voulu présider le jury de ma thèse.

Qu'il me soit permis également d'exprimer ici toute ma gratitude à M. Schoen, chef du Service de fermentation à l'Institut Pasteur.

Je remercie M. le professeur Guérillot d'avoir bien voulu me fournir du bicarbonate de sodium qu'il avait purifié avec le plus grand soin.

A des titres divers, M. L. Silberstein et M. P. Meunier m'ont rendu d'importants services que je n'oublierai pas.

I

APERÇU HISTORIQUE

En 1854, Braun et Bellingrodt ⁽⁴⁾ ont indiqué pour la première fois la présence de zinc dans diverses plantes calaminaires. Depuis, on a signalé la présence de ce métal dans plusieurs autres plantes. Mais la plupart de ces travaux ne faisaient aucune allusion au rôle physiologique de cet élément.

En 1870, Raulin ⁽⁵⁾, au cours d'un travail consacré à l'étude de l'influence des éléments minéraux sur le développement de l'*Aspergillus niger*, est arrivé à montrer que dans un milieu privé de zinc le développement de cet organisme est sensiblement inférieur, mais devient normal si on ajoute au milieu une petite quantité d'un sel de zinc. D'où ce savant conclut que le zinc est un élément essentiel pour la croissance normale de cet organisme.

Plus tard, répétant les travaux de Raulin en les modifiant un peu, Coupin ⁽⁶⁾ n'a pu arriver aux mêmes résultats, et il a conclu, contrairement à la pensée de Raulin, que l'*Aspergillus* n'a pas besoin de zinc pour sa croissance.

Ainsi cette question est restée confuse jusqu'au moment où Javillier ⁽⁷⁾ en a repris l'étude. Tout d'abord, grâce à une méthode très précise de séparation et de dosage de petites quantités de zinc basée sur la très faible solubilité du zincate de calcium, découverte par G. Bertrand ⁽⁸⁾, cet auteur a pu arriver à préparer un milieu synthétique privé de toute trace de zinc. Dans ce milieu, l'*Aspergillus niger* se développe très peu, mais si on lui ajoute une trace d'un sel de zinc, la croissance du micro-organisme devient normale. La concentration de zinc favorable à la croissance allait de 1×10^{-4} à 1×10^{-7} ; les concentrations supérieures à celle-ci ont un effet toxique. On voit ainsi la petitesse de la quantité de zinc nécessaire à la croissance normale de l'*Aspergillus*.

Après avoir éclairci ce point, et après avoir montré que le zinc est un élément essentiel pour l'*Aspergillus niger*, ce même auteur, continuant ses recherches, a découvert que le zinc agit de la même façon, non seulement sur la croissance de cet organisme,

mais sur celle de la levure ainsi que sur celle du blé (⁷). Il a montré que cette action est tout à fait spécifique, et, contrairement à ce que Lepierre pensait (¹⁰), qu'aucun autre métal ne le pouvait remplacer.

Plus tard, Mazé (¹¹) a trouvé que le zinc a un effet favorable sur la croissance du maïs, ce qui confirme les conclusions de Javillier.

Plus récemment (¹²), on a remarqué que la présence d'une trop faible proportion de zinc dans le sol provoque certaines maladies des plantes, ce qui démontre une fois de plus la relation étroite entre le zinc et le métabolisme végétal.

Pendant que certains chercheurs se sont occupés de la présence du zinc dans les tissus végétaux, d'autres se sont consacrés à l'étude de la diffusion de ce métal dans les tissus animaux. Il résulte de ces travaux que le zinc est aussi répandu dans les divers tissus animaux que dans les tissus végétaux.

C'est ainsi que Ghigliotto (¹³) a indiqué la présence du zinc chez les animaux. En appliquant une méthode de dosage plus précise et plus sensible que celle employée dans le même but, Delezenne (¹⁴) a pu arriver à montrer la présence de cet élément dans les divers organes de plusieurs espèces animales. En 1921, G. Bertrand a montré avec Vladesco (¹⁵) que cet élément est réparti d'une façon inégale dans les divers organes des animaux. Ainsi, chez le cheval, les testicules, les glandes mammaires et les ganglions lymphatiques sont particulièrement riches sans que, cependant, la proportion soit constante. La proportion du métal varie également beaucoup avec l'âge des animaux : elle est maxima dans le jeune âge, diminue pendant la période de lactation, puis augmente rapidement à partir du sevrage (¹⁶). Dans le hareng (¹⁷), G. Bertrand et Vladesco ont trouvé, en outre, que la teneur en zinc varie avec la périodicité de leur fonctionnement physiologique. Ces considérations les ont amenés à penser que le zinc joue un rôle physiologique aussi important chez les animaux que chez les plantes.

Continuant ces recherches, G. Bertrand et Benzon (²) ont réussi à réaliser un régime synthétique privé de toute trace de zinc. Administré à des souris, ce régime provoque l'arrêt de la croissance, puis quelques accidents caractéristiques rappelant les crises de l'avitaminose B et entraînant la mort en quelques jours. Par contre, le même régime contenant une très petite quantité de zinc permet la croissance des souris et la prolongation de la vie des animaux. L'utilité du zinc pour la croissance des souris est donc établie par ces auteurs.

Plus tard, quand nos connaissances sur les vitamines furent beaucoup plus avancées, et quand ces produits purifiés furent devenus facilement accessibles, G. Bertrand a repris cette question avec Bhattacharya ⁽³⁾. Ces auteurs ont trouvé que les souris soumises à un régime privé de zinc, comme dans les expériences de G. Bertrand et Benzon ⁽²⁾, mais contenant toutes les vitamines connues nécessaires à ces animaux, ne se développent pas normalement. Il y a un arrêt de croissance après les premiers jours, puis une chute régulière du poids entraînant la mort en quinze à vingt jours, tandis que le même régime avec une trace de zinc permettait une croissance normale et une prolongation de vie pendant plusieurs mois.

Ces résultats confirment une fois de plus ceux obtenus par G. Bertrand et Benzon ⁽²⁾ et indiquent la nécessité du zinc pour les animaux en voie de croissance.

McHargue ⁽¹⁸⁾ a effectué une expérience analogue avec les rats, mais en utilisant des produits non purifiés de leurs traces de zinc. Il a réussi cependant à montrer que les rats se comportent à peu près comme les souris dans les expériences précédentes.

Hubbel et Mendel ⁽¹⁹⁾ sont arrivés à la même conclusion avec les souris.

Malgré tous les travaux ci-dessus, McCollum ⁽²⁰⁾, dans un mémoire publié en 1933, a indiqué que les souris se développent aussi bien avec un régime sans zinc qu'avec le même régime additionné de zinc. Mais Stirn, Elvehjem et Hart ⁽²¹⁾, en répétant ce travail, ont montré que la caséine purifiée par la méthode de McCollum contenait assez de zinc pour empêcher toute comparaison. Ils ont montré que, quand on purifie les produits du régime afin de les débarrasser du zinc, on peut réaliser les résultats de G. Bertrand et Benzon ⁽²⁾ et G. Bertrand et Bhattacharya ⁽³⁾. Ils ont trouvé qu'avec un régime contenant les vitamines et le zinc les souris vivent et se développent normalement, et que ces animaux privés seulement du zinc ont une croissance comparativement très faible au commencement, et meurent en quelques jours.

De tout ce qui précède, il apparaît que le zinc est essentiel pour la nutrition des souris et des rats. Il nous a semblé intéressant de vérifier si les autres animaux ont le même besoin de cet élément ou si cette nécessité est particulière à certaines espèces. Dans ce but, passant des mammifères aux oiseaux, j'ai choisi comme sujet d'expérience le pigeon.

II

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

1. — TECHNIQUES DE DOSAGE DU ZINC

Dans ce travail, une méthode précise de dosage du zinc était constamment nécessaire, soit pour le contrôle de la pureté des réactifs utilisés, soit pour le dosage du zinc dans les produits d'origine biologique. J'ai utilisé la méthode basée sur l'insolubilité du zincate de calcium et mise au point par G. Bertrand et Javillier⁽⁸⁾, avec quelques changements.

Jusqu'à ces derniers temps, toutes les méthodes de dosage du zinc dans les produits d'origine biologique reposent sur trois principes : 1° Séparation de la partie minérale des parties organiques; 2° Séparation du zinc de ce mélange inorganique; 3° Évaluation du zinc ainsi séparé sous forme d'un dérivé convenable.

Pour la première étape, en général on fait la destruction de la matière organique soit par incinération, soit par des réactifs oxydants comme les acides nitrique, perchlorique, etc. J'ai utilisé la méthode d'incinération parce qu'elle demande moins d'attention.

Pour séparer le zinc des autres métaux, il y a plusieurs procédés. Mais tous séparent d'abord les métaux, comme le cuivre, le mercure, etc., en solution acide avec le sulfure d'hydrogène, puis les métaux comme l'aluminium, le fer et le chrome avec le chlorure d'ammonium et l'ammoniaque. Après, on précipite le zinc du filtrat à l'état soit de sulfure de zinc, soit de zincate de calcium. De temps en temps, on a indiqué qu'on peut séparer le zinc d'un mélange minéral d'origine biologique par le sulfure d'hydrogène à pH 3,0-3,5^(22, 23, 24). J'ai répété ce procédé, mais j'ai trouvé qu'il donne lieu à beaucoup d'erreurs. Après quelques essais avec des méthodes plus récentes, j'ai adopté, malgré sa longueur, la méthode de G. Bertrand et Javillier pour la séparation du zinc des autres métaux, comme étant la plus fidèle et la plus précise.

Dans cette dernière méthode, le zincate de calcium est dissous

dans de l'acide citrique et du citrate de sodium, puis on fait passer le sulfure d'hydrogène pour précipiter le zinc. J'ai employé le même procédé, mais en amenant le pH avec l'acide citrique et le citrate de sodium à la valeur entre 3,0 et 3,4 à l'aide de bromophénol bleu (voir Fales et Ware) ⁽²⁵⁾.

Dans le procédé de G. Bertrand et Javillier, on dose le zinc, séparé à l'état de sulfure de zinc, sous forme de sulfate de zinc. J'ai trouvé qu'on peut augmenter la sensibilité de ce dosage en précipitant le zinc sous forme de sel d'acide anthranilique par la méthode de Cimerman et Wanger ⁽²⁶⁾. L'acide anthranilique donne à pH 5,5-6,5 un précipité avec le zinc ayant la composition $\text{Zn}(\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{N})_2 = 337$, alors que le poids moléculaire du sulfate de zinc égale 131 seulement.

2. — TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA VITAMINE B¹

Les recherches qui font l'objet de ce travail ont nécessité un nombre considérable de dosages de la vitamine B¹. Pour effectuer ceux-ci, j'ai employé la méthode appelée *méthode curative*.

J'ai utilisé pour les expériences les pigeons ordinaires du commerce. Après leur arrivée au laboratoire, ils ont été nourris avec un mélange de blé (2 parties), de maïs (1 partie) et de sarrasin (2 parties) pendant quatre semaines. Après ce temps, ils ont reçu un régime de riz poli, de sels et d'eau ordinaire. Les pigeons étaient logés dans des cages de fer.

Les pigeons carencés en vitamine B¹ et montrant des symptômes d'opisthotonos bien nets sont choisis pour l'expérience. On leur donne, par gavage avec une pipette, une dose déterminée d'extrait ou de solution contenant la vitamine à doser. Quand cette dose contient assez de vitamine B¹, le pigeon guérit. On observe alors le nombre de jours pendant lesquels il reste bien portant. On divise la dose par le nombre de jours, et l'on obtient ainsi la dose curative par jour. En général, on a choisi des pigeons pesant entre 300-350 grammes pour ce dosage, mais quand les pigeons différaient de ce poids, on a calculé la moyenne statistique d'un nombre suffisant de résultats obtenus.

3. — LE RÉGIME

Riz. — Dans ces expériences, j'ai employé un régime composé de riz complété par des vitamines et de la caséine.

On sait, depuis le travail de G. Bertrand et Benzon ⁽²⁾, que le

riz contient seulement 2,5 mg. de zinc par kilo. On peut éliminer cette dernière trace de métal par la méthode suivante :

On lave le riz dans un courant d'eau pendant quatre heures. On le laisse ensuite tremper dans une solution d'acide chlorhydrique à 15 p. 100 pendant une heure. Puis on enlève l'acide et on lave le riz successivement avec de l'eau distillée et de l'eau bidistillée. On le laisse sécher à la température ordinaire pendant la nuit.

Quand il est bien sec, avant de le donner aux pigeons on le chauffe à l'autoclave pendant sept heures à 120° C. Cent grammes de riz ainsi obtenu ne contiennent aucune trace de zinc; j'ai pu m'en rendre compte en appliquant la méthode de G. Bertrand et Javillier (*). D'autre part, le riz ainsi préparé est tout à fait exempt de vitamine B¹.

Caséine. — La caséine employée au cours de mes travaux était préparée par le procédé de G. Bertrand et Benzon (*) :

On centrifuge 4 litres de lait afin de l'écrémer. On sépare la crème. On filtre le lait ainsi obtenu pour le débarrasser de la dernière trace de crème. On précipite la caséine par l'acide acétique. Dans mes expériences, j'ai remarqué que le succès de l'élimination complète du zinc dépendait beaucoup de cette étape. Si on précipite rapidement, ou avec un acide concentré, la caséine, séparée en gros morceaux, entraîne une grande quantité de solution contenant le zinc. En conséquence, j'ai précipité par une solution d'acide acétique à 10 p. 100, en agitant vigoureusement avec un agitateur mécanique. La caséine ainsi précipitée est suffisamment fine. On la laisse reposer pendant quelques minutes, on décante la partie aqueuse et on centrifuge le résidu. Après la centrifugation, on décante le liquide surnageant, on ajoute de l'eau au résidu, on triture pendant quelques minutes et on centrifuge à nouveau. On enlève l'eau et on répète ce lavage deux fois. Le résidu de ce traitement est dissous dans une solution d'ammoniaque d'une concentration de M/50. On filtre la solution, et on reprécipite avec de l'acide acétique dilué. On continue à laver plusieurs fois avec de l'eau comme avant. Le produit ainsi obtenu est dissous de nouveau dans l'ammoniaque et reprécipité. On répète ce processus trois fois. Après cette purification, on triture la caséine avec de l'alcool absolu et on filtre. On lave le résidu avec de l'éther et on sèche à l'étuve. On vérifie la pureté de ce produit par l'analyse. Dans mes expériences j'ai analysé 20 gr. de produit séché, et n'y ayant trouvé aucune trace de zinc, je l'ai employé.

Mélange salin de G. Bertrand et Bhattacharya. — J'ai utilisé le mélange salin de G. Bertrand et Bhattacharya ^(*), formant 4 p. 100 du régime donné aux animaux.

Sulfate de magnésium	0,250	gramme
Alun ferrico-ammoniacal	0,020	—
Alun aluminopotassique	0,004	—
Sulfate de cuivre.	0,002	—
Sulfate de manganèse.	0,002	—
Phosphate monopotassique	0,300	—
Phosphate disodique.	0,750	—
Lactate de calcium.	2,600	—
Fluorure de sodium.	0,004	—
Iodure de potassium.	0,0005	—
Bromure de potassium	0,0005	—
Chlorure de nickel.	0,005	—
Chlorure de cobalt.	0,005	—

J'ai eu besoin pour mes expériences de sels exempts de toute trace de zinc. Dans ce but j'ai choisi des produits du commerce très purs et je les ai cristallisés à plusieurs reprises jusqu'à ce qu'il n'y restât plus aucune trace de zinc. Pour le contrôle j'ai toujours utilisé la méthode de dosage de G. Bertrand et Javillier ^(*). Pour la cristallisation, je me suis servi exclusivement de l'eau bidistillée.

Après la purification de ces sels, j'ai préparé le mélange salin de G. Bertrand et Bhattacharya et dans 10 grammes de ce mélange j'ai dosé le zinc et je n'en ai plus trouvé.

Dans les expériences avec le zinc, j'ai complété ce mélange de sels avec 0,01 gramme de sulfate de zinc.

4. — LES VITAMINES

a) HUILE DE FOIE DE MORUE

Au cours de quelques expériences décrites dans les chapitres suivants, j'ai eu l'occasion de donner aux pigeons les vitamines liposolubles. Pour ce but, je me suis servi de l'huile de foie de morue.

On sait depuis le travail de G. Bertrand et Benzon ⁽²⁾ que l'huile de foie de morue contient toujours une petite trace de zinc. Mais on peut s'en débarrasser facilement par la méthode suivante :

On dissout l'huile de foie de morue dans dix fois son volume

d'éther. On lave cette solution successivement avec de l'eau bidistillée, une solution de soude diluée, de l'acide chlorhydrique dilué, de l'eau bidistillée. On chasse l'éther par distillation, on ajoute au résidu une quantité égale de benzène et on continue la distillation. Le benzène distille et entraîne l'eau. On répète cette opération avec le benzène jusqu'à ce que l'eau soit complètement enlevée. On sépare la dernière trace de benzène par distillation dans le vide à 60° C. Le résidu de cette huile ne contient pas de zinc, comme j'ai pu m'en rendre compte en analysant 10 centimètres cubes de ce produit.

b) PRÉPARATION D'UN EXTRAIT DE VITAMINE DU LAIT

J'ai utilisé cet extrait comme source de toutes les vitamines hydrosolubles nécessaires aux pigeons, en combinaison avec de l'extrait de foie.

Dans des expériences identiques avec les souris, G. Bertrand et Bhattacharya ont utilisé un extrait de vitamines B¹ et B² préparé par Seidell et enrichi par eux, mais ils ont trouvé qu'un mélange synthétique de ces vitamines hydrosolubles avec des vitamines liposolubles ne suffit pas à préserver les animaux de la mort. D'où il ressort qu'il y a encore d'autres facteurs inconnus, et qui manquent à ce mélange de vitamines. Pour remédier à cela, Stirn, Elvehjem et Hart ⁽²¹⁾ ont remplacé ce mélange de vitamines hydrosolubles par un extrait de lait additionné d'un extrait de foie. Le mélange de ces deux extraits, ajouté à un régime synthétique, s'est montré suffisant pour un développement normal des souris. Dans mes expériences, j'ai employé le même mélange avec une légère modification dans la préparation.

On met dans un flacon de 2 litres 1 litre de lait, on chauffe jusqu'à 40° C., on introduit ensuite un cm³ de présure. Après dix minutes, on augmente la température du mélange jusqu'à 46° C. et on laisse reposer. Après quatre heures, on décante la partie aqueuse, et on amène le pH à 4,5. On laisse reposer vingt-quatre heures. Le lendemain, on centrifuge, on sépare le liquide surnageant. On chauffe le liquide en agitant vigoureusement jusqu'à 88° C. et on refroidit encore une fois. Les protéïdes qui se précipitent, entraînant la plus grande partie de zinc, sont séparés par centrifugation. On amène le pH du filtrat au pH 3,5, et on fait passer un courant d'hydrogène sulfure. On filtre et on fait passer un courant d'azote dans le filtrat pour chasser le SH². La solution ne contient plus aucune trace de zinc, mais elle renferme encore

toutes les vitamines hydrosolubles. On dose la quantité de vitamine B¹ dans cette solution et on conserve dans une glacière.

c) EXTRAIT DE FOIE

L'extrait de foie était obtenu par une légère modification de la méthode de Stirn, Elvehjem et Hart ⁽²¹⁾.

Un kilo de foie frais est découpé en petits morceaux et traité par un litre d'alcool à 95 p. 100. On laisse reposer le tout dans la glacière pendant vingt-quatre heures, puis on sépare les protéides, etc., par centrifugation. On évapore le liquide dans le vide à 40° C. jusqu'à 30 centimètres cubes. On ajoute à ce résidu 500 cm³ d'alcool à 95 p. 100 et on répète l'opération comme avant. Le résidu obtenu après ce processus est dissous dans 100 cm³ d'eau. On amène le pH à 3,0 et on fait passer un courant de SH². On filtre le précipité et ensuite on chasse SH² par un courant d'azote. La solution ainsi obtenue a été employée comme extrait de foie. La quantité de vitamine B¹ contenue dans cet extrait était dosée par la méthode curative décrite plus haut. En dosant le zinc, je n'ai trouvé aucune trace de ce métal dans 20 cm³ de solution.

d) EXTRAIT DE LEVURE

J'ai utilisé la méthode de Peter et de ses collaborateurs ⁽²⁷⁾ pour préparer cet extrait. La levure (de boulangerie) employée provenait de la fabrique Springer; elle contenait 2,98 unités de vitamine B¹ par gramme de levure sèche (dosées par la méthode curative). La quantité d'humidité de cette levure est variable, mais, en général, j'ai trouvé qu'un kilo de levure fraîche donne 306 grammes de levure sèche. Par conséquent, un kilo de produit à l'état frais contient environ $306 \times 2,98 = 912$ unités de vitamine B¹.

Pour chaque extraction, 10 kilos de levure étaient utilisés. On laisse la levure pendant trois jours à la température du laboratoire pour l'autolyse et après on procède de la façon suivante :

On chauffe 2 litres d'eau dans un ballon de 5 ou 6 litres et, lorsque l'eau bout, on y fait tomber, par petits fragments, les 2 kilos de levure. Le mélange, qui se refroidit par cette addition, est porté de nouveau à l'ébullition qu'on maintient pendant cinq minutes seulement. Après, on centrifuge. Le liquide jaune clair est décanté et recueilli dans une grande bouteille. On jette le

résidu de levure. On répète cette opération avec une nouvelle quantité de levure. L'extraction de 10 kilos de levure prend en tout cinq heures.

A l'extrait clair ainsi obtenu, on ajoute 2 cm³ par litre de solution d'acétate de plomb à 25 p. 100 et on laisse reposer pendant la nuit.

Le lendemain, on filtre et on traite de nouveau la liqueur par l'acétate de plomb, jusqu'à ce que l'addition de ce réactif ne produise qu'un léger nuage. On filtre sur quatre ou cinq entonniers, de préférence pendant la nuit.

Le lendemain, on recueille le filtrat, auquel on ajoute en agitant vivement une suspension de baryte dans l'eau distillée bouillante renfermant 480 grammes de baryte par 120 cm³ d'eau. On laisse en repos pendant quelques minutes, puis on filtre sur un buchner. On acidifie le liquide avec de l'acide sulfurique dilué, le plus vite possible, jusqu'au pH 1,0 environ.

On sépare le sulfate de baryum précipité, on ajoute 20 gr. de « Norite » (marque de charbon actif) et on agite le mélange quelques minutes. On filtre.

Au liquide on ajoute une solution de soude de 20 p. 100 pour amener à un pH 6,8.

On ajoute à cette solution 40 grammes de « Norite » et on agite vigoureusement pendant dix minutes; ensuite, on filtre comme avant. On lave soigneusement le charbon avec de l'eau à plusieurs reprises.

Elution de la vitamine du charbon. — a) Elution par l'acide chlorhydrique N/2. On verse 120 gr. de charbon contenant la vitamine dans 400 cm³ d'une solution d'acide chlorhydrique de concentration N/2, on chauffe au bain-marie à 80° C. pendant quinze minutes, en agitant de temps en temps, puis on filtre. L'extrait contient la vitamine B, mais le charbon contient encore de la vitamine.

b) Elution par l'acide chlorhydrique N/10. Le charbon provenant de la première extraction est traité deux fois par l'acide chlorhydrique N/10 (200 cm³). Cet extrait est plus pur que les autres. Le charbon contient encore assez de vitamine B¹, que l'on enlève par la méthode suivante.

c) Elution par l'alcool à 50 p. 100. On traite le charbon qui reste après les extractions décrites plus haut par 500 cm³ d'alcool à 50 p. 100 à la température de 80° C. pendant quinze minutes. On filtre et on fait ainsi quatre extractions. On mélange les filtrats

et on amène le pH à 3,0. On évapore dans le vide. Le résidu est dissous dans l'eau, et le pH ajusté à 3,0. On traite par SH^2 . On filtre. On chasse SH^2 par N^2 , puis on concentre la solution dans le vide. On ajoute à la solution concentrée de l'alcool absolu en quantité suffisante pour avoir une teneur de 70 p. 100 d'alcool. On filtre. La liqueur sert à préparer l'extrait (Y).

Extrait (X). — Le produit de l'extraction par l'acide chlorhydrique N/10 provenant de 20 kilos de levure est utilisé pour la préparation de cet extrait. On ajoute à ce produit goutte à goutte une solution de chlorure de baryum tant qu'il se forme un précipité de sulfate. On concentre la solution jusqu'au volume de 100 cm³. Pendant cette concentration, on verse de temps en temps quelques gouttes d'une solution de chlorure de baryum pour précipiter les sulfates. Ensuite, on amène le pH du liquide à 3,5 et on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré pendant deux heures. On filtre le précipité et on concentre le filtrat dans le vide jusqu'à 10-20 cm³. On ajoute au résidu 40 cm³ d'alcool à 97 p. 100, selon la méthode de Kinnersley et Peter ⁽²⁸⁾, ce qui donne un produit soluble dans l'alcool à 99 p. 100.

On chasse l'alcool par distillation, on dissout le résidu dans 20 cm³ d'eau et on y ajoute une goutte d'acide chlorhydrique. On traite la solution avec 0,2 gr. de « Norite ». On filtre. On extrait le charbon ainsi traité avec 10 cm³ d'acide chlorhydrique de N/10, deux fois de suite. On mélange les trois filtrats, et on verse dans 25 cm³ d'une solution d'acide phosphotungstique à 10 p. 100. Le précipité de phosphotungstate est recueilli et décomposé par la baryte solide et une petite quantité d'eau. On décante la partie liquide. On élimine le baryum que renferme le filtrat par l'acide sulfurique dilué jusqu'au pH 3,0-4,0 avec l'acide chlorhydrique. On concentre la solution dans le vide à la température de 30° à 40° C.

L'extrait ainsi obtenu ne contient pas de zinc, c'est une solution pure de vitamine B₁. Dans les expériences décrites dans les chapitres suivants, il est cité comme *extrait (X)* de Carter, Kinnersley et Peter ⁽²⁹⁾.

Extrait (Y). — L'extrait acide dans l'alcool à 50 p. 100 décrit plus haut, provenant de 20 kilos de levure, est concentré au bain-marie jusqu'à 100 cm³. On ajoute pendant cette opération une solution de soude de temps en temps pour obtenir le virage au rouge Congo. On ajoute 200 cm³ d'eau bidistillée et on

amène le pH à 3,5. On fait passer un courant de SH^2 pendant une heure et demie. On filtre. On jette le précipité dans l'eau contenant quelques gouttes d'acide chlorhydrique et on fait passer un courant de SH^2 dans la suspension liquide pendant une demi-heure. On filtre. On mélange les deux filtrats et on fait bouillir pour éliminer SH^2 . On évapore jusqu'à 200 cm³ et on ajoute 40 cm³ d'alcool absolu et une quantité suffisante d'acide chlorhydrique pour amener le pH à 2,0. On conserve l'extrait dans une glacière. Ce produit est appelé *extrait (Y)* dans les expériences décrites aux chapitres suivants.

c) PRÉPARATION DE LA VITAMINE B¹ CRISTALLISÉE

Les extraits acides du charbon provenant de 50 kilos de levure sont mélangés et amenés à un pH 5,0 par NaOH. On verse 250 cm³ d'une solution d'acide phosphotungstique (Poulenc) déjà neutralisé à pH 5,0. On verse goutte à goutte dans ce mélange une solution d'acide sulfurique à 20 p. 100, jusqu'à ce que le pH devienne 1,0-2,0. On laisse reposer ce précipité pendant la nuit, le lendemain on filtre et on rejette le filtrat. Le précipité de phosphotungstate est placé dans quatre vases à centrifuger de 100 cm³, on ajoute une quantité égale de baryte solide, et on triture en ajoutant à chaque portion 25 cm³ environ d'eau. On centrifuge les émulsions ainsi obtenues, et on sépare la partie aqueuse. On ajoute de nouveau de l'eau au résidu, on triture et on centrifuge. On enlève le liquide. On continue ces triturations avec de l'eau jusqu'à ce que la solution devienne claire et cesse d'être alcaline. On acidifie le mélange des solutions aqueuses avec de l'acide sulfurique jusqu'à pH 3,0; on sépare le précipité et on évapore le liquide, en ajoutant du chlorure de baryum N/10 de temps en temps, jusqu'à un volume de 1 à 2 cm³. On verse 100 cm³ d'alcool absolu et on laisse reposer à 0° pendant douze heures.

On filtre, on mélange avec 10 cm³ d'eau, et on enlève l'alcool en évaporant dans le vide. On dissout le résidu dans 100 cm³ d'eau et on ajoute de la soude (5 N) pour amener à un pH 7,0. On verse 10 cm³ d'une solution de phosphotungstate de sodium. On centrifuge et on sépare la partie aqueuse (A). On décompose le résidu avec de la baryte, comme il a été indiqué ci-dessus, et on sépare la partie aqueuse. On amène cette solution à un pH 7,0, on verse une fois de plus 10 cm³ d'une solution de phosphotungstate de sodium. On centrifuge et on enlève la partie aqueuse (B).

On mélange les parties aqueuse (A) et (B), et on les traite avec de l'acide sulfurique, goutte à goutte. La vitamine B¹ se précipite comme sel de l'acide phosphotungstique. On laisse reposer quelques heures, on centrifuge et on rejette la partie aqueuse. On décompose le phosphotungstate par la baryte comme avant. On enlève le baryum de cet extrait par l'acide sulfurique, on amène à un pH 3,0, et on évapore cette solution dans le vide.

On extrait le résidu avec 100 cm³ d'alcool. On filtre, on évapore l'alcool dans le vide à 40° C. On dissout le résidu dans 15 cm³ d'eau. On centrifuge la partie insoluble dans l'eau, on amène le pH de cette solution à 3,0 et on verse 2,5 cm³ d'une solution de chlorure d'or. On laisse le mélange reposer une heure sur de la glace. Ensuite, on centrifuge et on sépare le précipité. On rejette la partie aqueuse.

On suspend le précipité aurique dans 15 cm³ d'une solution d'acide chlorhydrique (N/200) et on fait passer un courant d'hydrogène sulfuré. On filtre et on chasse l'hydrogène sulfuré par un courant d'azote.

On amène le pH de la solution à 3,5 avec de la baryte, et on verse une goutte d'une solution de chlorure de baryum à 10 p. 100. On concentre la solution jusqu'au volume de 0,6 cm³. On verse 5 cm³ d'alcool absolu, on chauffe le mélange, et on centrifuge. On enlève la partie liquide. On verse de nouveau 5 cm³ d'alcool, on chauffe et on centrifuge. On enlève la partie fluide. On traite le résidu par 3 gouttes d'eau et 2 cm³ d'alcool absolu, on chauffe, on refroidit, et on centrifuge. On enlève la partie liquide.

On mélange les trois parties liquides, on évapore jusqu'au volume de 2 cm³ et on centrifuge. Le résidu est dissous dans 2 cm³ d'alcool contenant 3 gouttes d'eau. On centrifuge et on rejette le résidu. Le liquide est mélangé avec la solution précédente et on évapore encore une fois jusqu'à 2 cm³. Les cristaux qui se séparent sont des cristaux de chlorhydrate de la vitamine B¹. On les recristallise par dissolution dans l'alcool absolu (2 cm³ pour chaque 20 mg.) contenant une goutte d'eau.

De chaque lot de 50 kilos de levure, la quantité de cristaux retirés atteignait près de 19 mg. En tout 135 kilos de levure ont été utilisés pour cette préparation.

III

ÉLIMINATION DU ZINC

McCollum (²⁰) et ses collaborateurs, dans leur travail sur l'influence du zinc dans la croissance du rat, ont indiqué que l'assimilation du zinc est liée à sa concentration dans l'aliment. Jusqu'à une certaine limite, la quantité de zinc retenu augmente proportionnellement à sa teneur dans le régime.

Au cours de mes expériences, j'ai voulu vérifier ces conclusions sur des pigeons. En même temps, j'ai essayé de trouver la quantité de zinc éliminée par ces animaux pendant la période d'avitaminose.

Dans ce but, j'ai déterminé d'abord la quantité de métal éliminée : 1° avec un régime normal; 2° avec le même régime additionné de zinc, et 3° enfin avec un régime de riz poli complété avec le mélange de sels de G. Bertrand et Bhattacharya.

LES ANIMAUX

Dans toutes les expériences décrites dans ce chapitre, j'ai choisi les pigeons adultes, non voyageurs. Après leur arrivée au laboratoire, ils ont été soumis pendant quatre semaines à un régime de blé, de maïs et de sarrasin, comme il a été indiqué plus haut. Ensuite, on a choisi parmi ces pigeons quatre de poids presque égal. On les a divisés en deux groupes, et on les a placés dans deux cages de verre.

Chaque cage de verre était composée d'une grande plaque de porcelaine de 50 cm. × 50 cm., servant de fond, et d'une cloche, genre cloche de pendule, de 42 cm. × 42 cm. × 72 cm. On a mis sur la plaque quatre supports en porcelaine de 5 cm. × 5 cm. × 8 cm., sur lesquels la cloche reposait, permettant ainsi le libre accès de l'air.

Dans deux récipients en verre on a mis deux fois par jour une quantité déterminée d'aliment et de l'eau. Les récipients étaient couverts avec une plaque de verre percée d'un trou suffisamment

large pour permettre l'accès aux pigeons. Ce procédé avait pour but d'empêcher les pigeons de répandre l'aliment dans la cage, ainsi que d'y déposer des excréments. Malgré cette précaution, les pigeons ont toujours dispersé un peu d'aliment dans les cages.

Chaque jour, on a déterminé les quantités d'eau et d'aliment consommées. On a recueilli aussi dans une capsule en porcelaine, chaque jour à 16 heures, les excréments de chaque cage. On a pesé les aliments dispersés par les oiseaux et entraînés dans les excréments et on les a ajoutés aux poids des aliments restants.

Les excréments et l'eau de lavage des cages étaient évaporés à sec, et on en faisait les cendres. On a dosé le zinc dans ces dernières. Les chiffres obtenus représentent les quantités de zinc éliminées. On a dosé d'autre part la teneur en zinc des aliments. On a obtenu ainsi les chiffres pour les quantités de zinc consommées et pour les quantités de zinc éliminées.

TABLEAU I

**QUANTITÉS DE ZINC ÉLIMINÉES PAR PIGEON
AVEC UN RÉGIME DE BLÉ ET D'EAU BIDISTILLÉE**

Jour	Quantités de Zn consommées par pigeon et par jour	Quantités de Zn éliminées par pigeon en 24 heures	Différences
1.	4,2 mg.	4,0 mg.	— 0,2 mg.
2.	4,0 —	4,0 —	0,0 —
3.	4,5 —	4,3 —	— 0,2 —
4.	3,9 —	3,8 —	— 0,1 —
5.	3,8 —	3,9 —	+ 0,1 —
6.	4,1 —	4,0 —	— 0,1 —
Moyenne .	4,1 mg.	4,0 mg.	

TABLEAU II

**QUANTITÉS DE ZINC ÉLIMINÉES PAR LES MÊMES PIGEONS
AVEC UN RÉGIME DE BLÉ ET D'EAU BIDISTILLÉE,
ADDITIONNÉ DE QUELQUES MILLIGRAMMES DE ZINC (*)**

Jour	Quantités de Zn dans l'aliment	Quantités de Zn incorporées	Total du Zn consommé	Quantités de Zn éliminées en 24 heures	Différences
1 . .	4,5 mg.	1,0 mg.	5,5 mg.	5,0 mg.	— 0,5 mg.
2 . .	4,3 —	—	5,5 —	5,0 —	— 0,5 —
3 . .	4,6 —	—	5,6 —	4,3 —	— 1,3 —
4 . .	4,2 —	—	5,2 —	4,6 —	— 0,6 —

(*) Dans cette expérience, on a incorporé le zinc à 0,5 gr. de fécule de pomme de terre privée de zinc, et on a confectionné des boulettes que l'on a données aux pigeons.

Jour	Quantités de Zn dans l'aliment	Quantités de Zn incorporées	Total du Zn consommé	Quantités de Zn éliminées en 24 heures	Différences
5 . . .	4,0	1,0 mg.	5,0	5,0	— 0,0
6 . . .	4,4		5,4	5,3	— 0,1
7 . . .	4,7		5,7	5,6	— 0,1
8 . . .	4,5		5,5	5,7	+ 0,1
9 . . .	4,5		5,5	5,8	+ 0,3
10 . . .	4,4	2,0 mg.	5,4	5,4	0,0
11 . . .	4,3		6,3	5,3	— 1,0
12 . . .	4,2		6,2	5,5	— 0,7
13 . . .	4,5		6,5	5,7	— 0,8
14 . . .	4,1		6,1	5,8	— 0,3
15 . . .	4,4	—	6,4	5,9	— 0,5
16 . . .	4,7		6,7	6,5	— 0,2
17 . . .	4,5		6,5	6,7	— 0,2
18 . . .	4,3		6,3	6,4	— 0,1

TABLEAU III

ÉLIMINATION DU ZINC AVEC UN RÉGIME DE RIZ POLI ET DE SELS DE G. BERTRAND ET BHATTACHARYA (AVEC ZINC)

Dans cette expérience, j'ai utilisé deux pigeons seulement.

Pigeon N° 1

Jour	Quantités de Zn consommées	Quantités de Zn éliminées après 24 heures	Différences
1	3,9 mg.	3,8 mg.	— 0,1 mg.
2	3,5	3,4	— 0,1
3	3,2	3,0	— 0,2
4	3,6	3,7	+ 0,1
5	3,3	3,2	— 0,1
6	3,1	3,2	0,1
7	3,4	3,3	— 0,1
8	3,3	3,3	0,0
9	3,1	3,3	+ 0,2
10	2,8	3,1	0,3
11	3,0	3,2	+ 0,2
12	3,6	3,5	0,1
13	2,9	3,2	+ 0,3
14	3,0	2,9	— 0,1
15	3,0	3,2	+ 0,2
16	3,0	3,5	+ 0,5
17	2,9	3,2	+ 0,3
18	2,5	3,2	+ 0,7
19	2,0	3,5	+ 1,5
20	2,0	3,4	+ 1,4

Jour	Quantités de Zn consommées	Quantités de Zn éliminées après 24 heures	Différences
21	2,0	3,7	+ 1,7 —
22	1,8	2,8	+ 1,0
23	1,1	1,5	+ 0,4
24	0,1	0,0	- 0,1
25	0,1	0,1	0,0
26	trace	0,0	
27	—	0,0	devenu malade.

Pigeon N° 2

Jour	Quantités de Zn consommées	Quantités de Zn éliminées après 24 heures	Différences
1	3,4 mg.	3,4 mg.	0,0
2	3,2 —	3,3 —	+ 0,1 mg.
3	3,4 —	3,2 —	+ 0,1
4	2,8 —	3,0 —	+ 0,2
5	3,3 —	3,1 —	+ 0,2 —
6	3,2 —	3,2 —	0,0
7	2,7 —	3,1 —	+ 0,4
8	2,3 —	3,0 —	+ 0,7 —
9	2,2 —	2,9 —	+ 0,7 —
10	2,1 —	2,5 —	+ 0,4 —
11	1,8 —	2,0 —	+ 0,2 —
12	1,0 —	1,5 —	+ 0,5 —
13	0,7 —	1,8 —	+ 1,1 —
14	0,3 —	2,0 —	+ 1,7 —
15	0,2 —	2,0 —	+ 1,8 —
16	0,1 —	1,5 —	+ 1,4 —
17	0,2 —	0,7 —	+ 0,5 —
18	0,0	0,2 —	+ 0,2 —
19	trace	0,0	
20	—	0,0	
21	—	0,0	
22	—	0,0	devenu malade.

TABLEAU IV

**MÊME EXPÉRIENCE QUE CI-DESSUS. MAIS SANS ZINC
DANS LE RÉGIME**

Pigeon N° 1

Jour	Quantités de Zn consommées	Quantités de Zn éliminées après 24 heures	Différences
1	0,0 mg.	2,2 mg.	+ 2,2 mg.
2	—	1,8	+ 1,8 —
3	—	0,9 —	+ 0,9 —

Jour	Quantités de Zn consommées	Quantités de Zn éliminées après 24 heures	Différences
4	0,0 mg.	0,8	+ 0,8 —
5	—	0,5	+ 0,5 —
6	—	0,1	+ 0,1 —
7	—	0,0	0,0 —
8	—	0,0	0,0 —
9	—	0,0	0,0 —
10	—	0,0	0,0 —
11	—	0,18	+ 0,18 —
12	—	0,2	+ 0,2 —
13	—	0,5	+ 0,5 —
14	—	0,9	+ 0,9 —
15	—	0,8	+ 0,8 —
16	—	1,2	+ 1,2 —
17	—	0,7	+ 0,7 —
18	—	0,4	+ 0,4 —
19	—	0,0	0,0 —
20	—	0,0	devenu malade.

Pigeon N° 2

Jour	Quantités de Zn consommées	Quantités de Zn éliminées après 24 heures	Différences
1	0,0 mg.	3,0 mg.	+ 3,0 mg.
2	—	2,9	+ 2,9 —
3	—	2,0	+ 2,0 —
4	—	1,1	+ 1,1 —
5	—	0,2	+ 0,2 —
6	—	0,1	+ 0,1 —
7	—	0,1	+ 0,1 —
8	—	0,1	+ 0,1 —
9	—	0,1	+ 0,1 —
10	—	0,5	+ 0,5 —
11	—	0,9	+ 0,9 —
12	—	0,8	+ 0,8 —
13	—	1,2	+ 1,2 —
14	—	1,7	+ 1,7 —
15	—	1,92	+ 1,92 —
16	—	2,0	+ 2,0 —
17	—	0,8	+ 0,8 —
18	—	0,7	+ 0,7 —
19	—	0,5	+ 0,5 —
20	—	0,6	+ 0,6 —
21	—	0,3	+ 0,3 —
22	—	0,1	+ 0,1 —
23	—	0,0	0,0 —
24	—	0,0	devenu malade

Dans les tableaux, « *trace* » indique une quantité inférieure à 0,01 mg. de zinc.

*
* *

Il ressort de ces tableaux qu'avec un régime normal l'élimination du zinc par les pigeons ordinaires est proportionnelle à la quantité consommée.

Avec un excès de métal, il y a d'abord une rétention, puis il se produit un équilibre nouveau, et la quantité consommée devient presque égale à la quantité éliminée.

Cependant, avec un régime de riz poli, il y a au commencement un excès d'élimination de zinc par rapport à la quantité consommée. Puis cet excès décroît et devient enfin presque nul. Mais ensuite, avec les progrès de l'avitaminose, la quantité de zinc éliminée dépasse une fois de plus la quantité consommée, et cela jusqu'à la fin, le maximum étant situé entre douze et vingt-deux jours à partir de la mise au régime.

L'addition d'un excès de zinc pendant cette période ne change pas le caractère de l'élimination. L'excès de zinc est éliminé sans qu'aucune tendance à la rétention se manifeste.

IV

ZINC ET CROISSANCE DU PIGEON

Depuis la découverte de Eijkman ⁽³⁰⁾, qu'un régime de riz poli provoque chez le pigeon une polynévrite analogue au béribéri de l'homme, de nombreuses recherches ont été effectuées sur ce sujet avec le même animal. Presque toutes nos connaissances sur le besoin nutritif du pigeon proviennent de ces observations.

En général, on nourrit les pigeons avec un régime de riz poli et un supplément de vitamine. Mais, à l'heure actuelle, il y a une grande controverse sur la question de savoir si ce régime est bien complet pour le pigeon.

C'est ainsi que Schaumann ⁽³¹⁾ a constaté que le riz poli avec seulement un supplément de vitamine B n'était pas un régime complet pour les pigeons, tandis que Funk ⁽³²⁾ pense autrement. Mais on peut expliquer ces divergences par le fait que, tandis que l'un de ces auteurs a considéré comme un bon indice de nutrition la conservation du poids et l'action prophylactique contre la polynévrite, l'autre a jugé que le signe de bien-être consistait seulement en l'absence de polynévrite. Ce dernier suppose que les facteurs empêchant l'apparition de la polynévrite maintiennent aussi le poids.

Cependant, en 1916, William et Seidell ⁽³³⁾ ont montré qu'on peut séparer de la vitamine concentrée les facteurs curatifs et les facteurs maintenant le poids; ces deux auteurs pensaient que la vitamine B se dédouble en ces deux facteurs. Mais Emmett et McKim ⁽³⁴⁾ ont montré que le supplément de vitamine B adsorbée soit sur la terre à foulon, soit sur le réactif de Lloyd, produit une augmentation de poids, à condition qu'on en donne suffisamment à l'animal. Ils ont trouvé également qu'il existe une différence quantitative entre la quantité nécessaire pour guérir seulement et celle qui provoque l'augmentation de poids maxima.

En 1921, Kellaway ⁽³⁵⁾ a indiqué que le riz poli donne avec l'extrait appelé « marmite » une augmentation de poids, tandis que Plimmer et Rosedale ⁽³⁶⁾ ont affirmé que la « marmite », le

riz et la poudre de poisson constituent ensemble un régime complet pour le pigeon. Ce régime préserve les animaux de la polynévrite et maintient leur poids.

Cependant, Seidell (^{37, 38}) a introduit la méthode de dosage de cette vitamine par le maintien de poids, la méthode curative ne lui donnant pas satisfaction. Mais cet auteur suppose que le produit qui maintient le poids est le même que celui qui empêche la polynévrite.

William et ses collaborateurs (^{39, 40, 41}) ont signalé que les pigeons nourris de riz poli et de vitamines A, D et B¹ pendant quarante-cinq jours ont besoin encore d'une autre vitamine, qu'ils ont nommée vitamine B³. Le besoin des pigeons d'une autre vitamine encore, à part les vitamines A, D et B¹, a été indiqué en même temps par Simonet et Randoin (⁴²). Les travaux de Carter et O'Brien (^{43, 44}), d'O'Brien et autres (⁴⁵), ont confirmé cette conclusion.

Peter, Kinnersley et Carter (²⁹) ont trouvé qu'à côté de la vitamine A, D et B¹, les pigeons ont encore besoin d'un quatrième facteur qu'ils ont nommé vitamine B⁵. Ils ont montré que celle-ci est très stable en présence d'alcali et qu'elle diffère dans ses propriétés de toutes les autres vitamines hydrosolubles, comme B¹, B², B³ et B⁴.

Toutes les considérations ci-dessus montrent que le pigeon a besoin de trois vitamines du groupe B, B¹, B³ et B⁵, ainsi que des deux vitamines liposolubles A et D. On sait que le pigeon n'a pas besoin de vitamine C. Par conséquent, on peut conclure que le pigeon peut vivre normalement avec un régime contenant des quantités suffisantes de glucides, de matières grasses, de protéides et des minéraux nécessaires, pourvu que les vitamines A, D, B¹, B³ et B⁵ ne manquent pas.

Le riz poli contient 6,7 p. 100 de protéides, tandis que le blé en contient 11,1 p. 100. C'est un fait bien connu que le blé constitue un régime complet pour le pigeon. Par conséquent, un régime de riz seulement additionné des vitamines n'est pas suffisant, car il y manque des protéides. Carter et O'Brien (⁴³) ont trouvé que les pigeons qui ont perdu 45 p. 100 de leur poids initial ont besoin de caséine à côté des vitamines pour reprendre leur poids primitif.

RECHERCHES PERSONNELLES

Des travaux cités plus haut on peut conclure que les pigeons peuvent se développer normalement avec un régime composé de

riz poli additionné des vitamines A, D, B¹, B³ et B⁵, ainsi que de quelques protéides comme la caséine.

Pour le premier essai sur l'effet du régime privé de zinc, j'ai utilisé des pigeons adultes.

EXPÉRIENCES 1, 2, 3 ET 4

Les pigeons employés dans ces expériences étaient nourris avec un régime composé de blé, de maïs et de sarrasin pendant quatre semaines avant le commencement des expériences proprement dites.

Parmi ces pigeons, on a choisi un lot de quatre mâles, ou de quatre femelles, ou bien de deux mâles et de deux femelles, chaque individu pesant 350-400 grammes environ. Ces animaux ont été divisés en deux groupes, composés chacun soit de deux mâles ou de deux femelles, ou bien d'un mâle et d'une femelle. On a placé les lots dans deux des cages de verre décrites dans le chapitre précédent.

Comme nourriture, on a donné le riz poli additionné du mélange salin de G. Bertrand et Bhattacharya (³), et pour boisson, l'eau bidistillée *ad libitum*. On a donné par gavage à chaque pigeon 2 grammes de caséine exempte de toute trace de zinc. Dans ce but, une émulsion de caséine a été préparée avec de l'eau et on l'a donnée aux pigeons à la pipette. La vitamine B était préparée à partir du lait et du foie par la méthode de Stirn, Elvehjem et Hart (²¹). La quantité administrée par jour à chaque pigeon contenait 8 unités de vitamine B¹ (dose curative). Les pigeons ont reçu également tous les deux jours 2 gouttes d'huile de foie de morue purifiée et mélangée avec du beurre de coco purifié par la méthode de G. Bertrand et Benzon (²). A un de ces deux groupes on a administré chaque jour avec la caséine 2,0 mg. de sulfate de zinc.

Les cages étaient nettoyées et l'aliment ainsi que l'eau changés deux fois par jour, afin d'empêcher la moindre contamination du régime par les excréments. On a pesé les animaux tous les jours.

Les résultats obtenus dans cette expérience, consignés dans la figure 1, montrent que les deux groupes de pigeons nourris avec le régime complet, additionné de vitamines, se comportent différemment selon que ce régime contient en supplément du zinc ou non. Les pigeons recevant le zinc diminuent de poids pendant les six premiers jours, puis ils demeurent stationnaires pen-

dant toute la durée de l'expérience. La variation de poids pendant ce temps était toujours inférieure à 5 grammes. D'autre part, les pigeons sans zinc diminuent continuellement de poids pendant les périodes d'expérience. La chute de poids, petite au commencement, devient grande après une quinzaine de jours et, à la fin, très rapide, amenant finalement la mort entre le vingt-septième et le trente-cinquième jour.

L'expérience a été répétée de la même manière avec trois autres groupes de pigeons (voir fig. 2, 3 et 4), et les résultats obtenus ont été identiques. Dans l'expérience n° 3, un des pigeons sans zinc est resté vivant trois mois, mais il a manifesté des symptômes de paralysie des pattes, caractéristiques des animaux avitaminés en B¹.

Ces résultats nous ont amené à conclure que le zinc est un élément essentiel pour la croissance des pigeons, et qu'en son absence du régime les vitamines favorisant la croissance des animaux ne suffisent plus à maintenir le poids.

EXPÉRIENCES 5 ET 6

Dans ces expériences on a encore pris quatre pigeons de 350-450 gr. environ, et on les a placés dans les cages de verre.

On les a nourris de la même façon avec du riz poli et des sels, mais on n'a pas donné de caséine. Comme avant, on a donné tous les deux jours, comme vitamines A et D, de l'huile de foie de morue purifiée. Comme vitamine B, on leur a donné les extraits (X) et (Y) en quantité égale contenant ensemble 12 unités de vitamine B¹.

L'expérience a duré trente jours et on l'a répétée encore une fois avec deux lots de quatre pigeons (voir fig. 5 et 6).

Les résultats montrent qu'en présence de zinc, les préparations de vitamine B¹ contenant les autres facteurs de croissance ne suffisent pas à maintenir le poids. Tandis qu'en présence de ce métal les vitamines agissent normalement.

EXPÉRIENCE 7

Dans cette expérience, quatre pigeons adultes étaient groupés en deux lots dans deux cages de verre. On a donné comme alimentation du riz poli purifié et le mélange de sels de G. Bertrand et Bhattacharya⁽³⁾, sauf le sulfate de zinc, pour les neuf premiers jours. Le dixième jour, on a administré aux quatre pigeons des

extraits (X) et (Y) de levure, préparés par la méthode de Peter, Carter, Reader et O'Brien (²⁷), en quantité contenant ensemble presque 12 unités de vitamine B¹. En même temps, on a injecté à deux des pigeons 2,0 mg. de sulfate de zinc par jour.

On a remarqué que pendant les neuf premiers jours le poids des pigeons diminue continuellement. Après ce temps, quand on a donné les extraits de levure, extraits (X) et (Y), la chute de poids s'arrête seulement dans le cas des pigeons recevant un supplément de zinc. On peut voir aussi que, dans ce dernier cas, non seulement la perte de poids s'arrête, mais qu'il y a une augmentation légère et continue du poids, alors que chez les pigeons privés de zinc l'amaigrissement continue (voir fig. 7).

EXPÉRIENCE 8

On a déjà indiqué que Peter et ses collaborateurs ont trouvé que la vitamine B¹ ne suffit pas à elle seule à maintenir le poids des pigeons nourris avec le riz, et que, pour cela, un autre facteur est nécessaire.

Ce dernier est présent dans leur extrait (Y) ainsi que dans la marmite « alcalinisée et autoclavée à 120° C. ». Ensuite, ils ont constaté que, pour avoir une augmentation de poids, les pigeons ont besoin encore d'un troisième facteur, B³. Ils ont pensé qu'en présence d'un de ces facteurs, complété par la vitamine B¹, on peut avoir seulement une conservation de poids, et en présence des trois facteurs une augmentation de poids.

Dans les expériences précédentes, on a signalé que les extraits (X) et (Y) de levure ne suffisent pas à maintenir le poids des pigeons en l'absence de zinc. Les extraits de Stirn, Elvehjem et Hart, qu'on peut supposer contenir tous les facteurs B, sont également incapables de maintenir le poids des animaux en l'absence de ce métal. Par conséquent, on peut supposer ou bien que le zinc est l'un de ces facteurs, ou bien qu'il est un facteur différent.

Pour trancher cette question, j'ai entrepris l'expérience suivante :

Comme avant, on a choisi quatre pigeons adultes divisés en deux groupes et on les a placés dans deux cages de verre. On les a nourris avec du riz poli, du mélange de sels de G. Bertrand et Bhattacharya et de l'eau bidistillée *ad libitum*. Comme vitamine, on a donné seulement l'extrait (X) de Carter, Kinnersley et Peter, décrit dans le chapitre précédent. Le poids des pigeons diminue

continuellement pendant les six premiers jours. Après ce laps de temps, on a donné à l'un des deux groupes 1,5 gr. de « marmite » alcalinisée par pigeon et aux autres 2,0 mg. de sulfate de zinc dissous dans 0,3 cm³ d'eau.

Les pigeons qui ont reçu de la « marmite » demeurent stationnaires, tandis que ceux qui ont reçu du zinc maigrissent continuellement. Par conséquent, le zinc n'est pas identique au facteur B⁵.

CONCLUSIONS

Les résultats des expériences précédentes établissent nettement que le zinc est un élément indispensable à la croissance des pigeons.

En l'absence de ce métal, les vitamines B¹, B³ et B⁵, reconnues comme nécessaires aux pigeons, ne suffisent pas à maintenir leur poids ou à empêcher leur mort. Tandis qu'en sa présence on constate une nutrition normale.

Les vitamines B¹ et B⁵ qui, normalement, devraient maintenir le poids, n'y sont pas parvenues en l'absence de ce métal.

Le zinc ne pouvait pas être la vitamine B³ parce que celle-ci n'est pas stable aux alcalis.

J'ai trouvé qu'il n'est pas non plus identique au facteur B⁵.

V

INFLUENCE DU ZINC ET DE LA VITAMINE B¹ SUR LA RESPIRATION ET LE MÉTABOLISME DES GLUCIDES DES TISSUS

Les résultats des expériences citées au chapitre précédent m'amènent à considérer le zinc comme un facteur important de la croissance. On a vu qu'il suffisait de donner un régime contenant 100 mg. de zinc par kilo pour avoir une croissance normale, à condition que toutes les autres substances y soient incorporées, tandis que l'absence de ce métal du régime produit des conditions physiologiques défectueuses et entraîne la mort. En même temps, on a trouvé que l'action de la vitamine B¹ chez les pigeons varie sensiblement suivant que leur régime contient ou non du zinc.

1. LE RÔLE PHYSIOLOGIQUE DE LA VITAMINE B¹

Influence de la vitamine sur la respiration. — Les travaux concernant les relations entre la vitamine B¹ et le métabolisme sont très nombreux et contradictoires. Dans l'ensemble, on peut les diviser en deux groupes : 1^o les travaux concernant le rôle de cette vitamine dans le métabolisme global; 2^o les travaux ayant trait au rapport entre cette vitamine et l'un ou l'autre des composants de l'alimentation. Mais il faut ajouter que la plupart de ces travaux ont été effectués avant que l'on ait connu la nature complexe de la vitamine B.

Un premier phénomène, et le plus caractéristique, observé chez des pigeons carencés en vitamine B¹, est l'abaissement de température de leur corps, spécialement pendant la dernière étape de la maladie, quand la régulation thermique n'a plus lieu (Eijkmann (³⁰), Drummond (³⁶), Novaro (³⁷), Abderhalden (⁴⁸), Cramer, Drew et Mottram (⁴⁹), McCarrison (⁵⁰), Farmer et Radenbaugh (⁵¹), Drummond et Marrian (⁵²) et Kon (⁵³). Après cette observation, on a remarqué une relation indirecte entre l'avitaminose B¹ et l'affaiblissement de quelques oxydases chez les animaux. C'est

ainsi que Dutcher ⁽⁵¹⁾ a montré une diminution de la catalase de quelques animaux avitaminés en B¹, tandis que Findlay ⁽⁵²⁾ a indiqué un affaiblissement de la teneur en glyoxalase dans le foie des animaux également carencés. Cette anomalie disparaît avec une dose suffisante de vitamine B¹. Plus récemment, Birch ⁽⁵³⁾ a noté une pareille diminution de la désaminase dans les tissus des muscles cardiaques des animaux carencés en B¹.

Mais, sur le pouvoir oxydant des tissus dans leur ensemble, les auteurs ne sont pas d'accord. On a trouvé chez les animaux vivants, en même temps que l'abaissement de la température, un métabolisme basal diminué, ainsi que quelques altérations dans les échanges respiratoires. Ces deux phénomènes ont été signalés pour la première fois par Ramoino ⁽⁵⁴⁾, mais c'est Abderhalden ⁽⁵⁵⁾ qui a attiré l'attention sur leur importance. Cependant Drummond et Marrian ⁽⁵⁶⁾ ne sont pas d'accord sur cette interprétation. Ils ont montré que l'abaissement du métabolisme basal et l'altération de l'échange respiratoire se produisent par suite de l'inanition plutôt que par l'absence de vitamine B¹. Les travaux d'Anderson et Kelp ⁽⁵⁷⁾, Gulick ^(58, 59), Farmer et Radenbaugh ⁽⁶⁰⁾, Gulvao et Cardoso ⁽⁶¹⁾, et ceux de Roche ⁽⁶²⁾ nous amènent à la même conclusion.

Dans les tissus isolés, Abderhalden ⁽⁶³⁾, Hess ⁽⁶⁴⁾, Hess et Messerle ⁽⁶⁵⁾ ont indiqué qu'il apparaît un changement spécifique, soit du pouvoir oxydant, soit du pouvoir réducteur de bleu de méthylène en présence ou en l'absence de l'acide succinique. Mais Roche ⁽⁶²⁾ a critiqué ce résultat et n'a pu trouver aucune indication de cette diminution du pouvoir oxydant. Plus tard, d'une étude comparative des effets de coloration par le bleu de méthylène sur les tissus des pigeons normaux, affamés et poly-névriques, Kollath ⁽⁶⁶⁾ a constaté que chez ces derniers il y a un changement du potentiel d'oxydo-réduction de quelques organes, associé peut-être au changement de perméabilité des cellules. Plus tard, après cette découverte, Abderhalden et Vlassopoulos ⁽⁶⁷⁾ ont fourni une fois de plus la preuve expérimentale de la différence entre l'absorption de l'oxygène par les tissus des pigeons avitaminés et normaux, en l'absence de divers substrats. Peter et Gavrilescu ⁽⁶⁸⁾, en répétant ce travail, ont adopté une méthode pareille, mais ils ont trouvé, en l'absence de tout substratum, un abaissement très faible du pouvoir oxydant des tissus avitaminés par rapport à celui des animaux normaux. Cet affaiblissement est insignifiant du point de vue statistique. Cependant, ils ont montré qu'en présence d'un substratum

comme le dextrose, ou, mieux, en présence d'acide lactique, on peut voir cet affaiblissement, qui est de l'ordre de 20 et 40 p. 100 respectivement. Avec l'acide succinique comme substratum, ils n'ont pas réussi à observer un pareil phénomène. Depuis ce temps, Peter et ses collaborateurs ont publié plusieurs autres résultats qui confirment cette observation.

2. L'INFLUENCE DE LA VITAMINE B¹ SUR LE MÉTABOLISME GLUCIDIQUE

Les troubles désignés sous le nom de béribéri sont en relation étroite avec la richesse de l'alimentation en glucides. On a conclu de cette observation ancienne que la vitamine B¹ intervient dans le métabolisme glucidique. Ce fait a été confirmé par les travaux de Funk (⁷²), Funk et Schonborn (⁷³), Randoïn (⁷⁴), etc.

Findlay (⁶⁵) a observé un affaiblissement de la glyoxalase de 50 p. 100 dans les divers organes des pigeons carencés en B¹, puis, après administration de vitamine B¹, l'augmentation de cette diastase devient presque normale. Il a montré que la vitamine B¹ ne fonctionne pas rigoureusement comme coenzyme de cette diastase, parce qu'il n'a pas trouvé d'augmentation de l'action de la glyoxalase, sauf par l'entremise des cellules intactes. Tous ces résultats ont amené à penser qu'au cours du béribéri aviaire, il y avait un trouble dans le mécanisme du métabolisme des glucides. Mais ce sont seulement des travaux récents qui ont permis de préciser ces modifications.

Au cours de recherches approfondies sur le métabolisme du béribéri chez l'homme, Inawashiro et Hayasaka (⁷⁵), Hayasaka et Inawashiro (⁷⁶) ont constaté que, pendant cette maladie, la quantité d'acide lactique du sang est plus élevée que la quantité normale et qu'il faut beaucoup plus de temps pour revenir au taux primitif après un effort musculaire. Collazo et Morellin (⁷⁷) ont montré que dans divers organes des oiseaux avitaminés il y avait un excès d'acide lactique. Kinnersley et Peter (⁷⁸) ont également trouvé dans les cerveaux des pigeons carencés en vitamine B¹, après leur mort, une forte teneur en acide lactique. Et cette augmentation s'observe surtout dans les lobes optiques et les parties grises du cerveau.

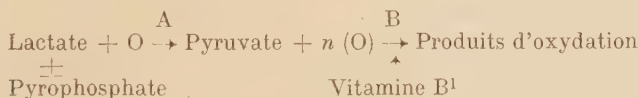
Bientôt après cette observation, Peter et ses collaborateurs ont commencé une étude plus approfondie. Ils ont trouvé une diminution de l'absorption d'oxygène en présence de l'acide lactique par les tissus des animaux avitaminés, et ils ont pu ramener cette

valeur à la normale par addition d'une quantité de vitamine B¹, soit en solution concentrée, soit sous la forme cristallisée.

Cependant il faut ajouter qu'ils n'ont pas trouvé que la vitamine B¹ ait eu un effet quelconque sur le cerveau des oiseaux normaux. Auparavant, ils ont observé que la respiration des tissus isolés des oiseaux avitaminés augmente de 0,68 à 0,86 par addition de vitamine B¹. Ces deux expériences montrent que l'absence de la vitamine B¹ provoque une chute du métabolisme des glucides à une certaine étape concernant les corps à trois molécules de carbone. Au début, on a pensé que c'était l'acide lactique dont l'oxydation était catalysée par la vitamine B¹ (Peter et Kinnersley ⁽⁷⁸⁾). Mais Meikeljohn ⁽⁷⁹⁾ n'a trouvé aucun rapport entre l'augmentation de la respiration et la quantité d'acide lactique disparue pendant ce processus. Ce fait a mis en doute l'hypothèse de l'oxydation de l'acide lactique.

En 1933, Peter et Sinclair ⁽⁸⁰⁾ ont rencontré une indication de la formation d'acide pyruvique comme un produit anormal dans le milieu dans lequel les tissus avitaminés ont respiré pendant quelques instants. Peter et Thompson ⁽⁸¹⁾ ont ensuite confirmé cette observation. Un peu plus tard, Thompson et Johnson ⁽⁸²⁾ ont réussi à démontrer la présence de l'acide pyruvique dans le sang des animaux avitaminés. Cette découverte est très importante, car elle montre définitivement que le phénomène observé dans les tissus a lieu à la fois *in vivo* et *in vitro*.

Par là Peter et ses collaborateurs ⁽⁸³⁾ ont été amenés à penser que la vitamine B¹ prend une part active dans l'oxydation de l'acide pyruvique, l'absence de ce facteur nutritif provoquant une augmentation de l'acide dans les tissus et dans le sang. Ils ont représenté cette hypothèse par le schéma suivant :



Ces auteurs ont donné des preuves que la vitamine B¹ règle le processus d'oxydation de l'acide pyruvique à l'étape B.

Sherman et Elvehjem ^(84, 85) sont arrivés à peu près à la même conclusion en travaillant avec le cerveau de poussins avitaminés.

Il ressort de tous ces travaux que la vitamine B¹ représente soit un coenzyme de l'oxydase du pyruvate, soit peut-être le groupement prosthétique de cette oxydase elle-même, comme dans le cas de l'oxydase jaune de Warburg ⁽⁸⁶⁾.

Il est intéressant de noter que, plus récemment, Lohman ⁽⁸⁷⁾ a trouvé que la cocarboxylase est un dérivé phosphorique de la vitamine B¹, ce qui est confirmé par un travail de Stirn et Hoper ⁽⁸⁸⁾ qui ont montré que la vitamine B¹ de synthèse obtenue par les méthodes de Gewe ⁽⁸⁹⁾, William et Kline ⁽⁹⁰⁾, et Todd et Bergel ⁽⁹¹⁾, après le traitement par l'oxychlorure de phosphore, donne un corps phosphoré réagissant comme la cocarboxylase.

3. L'INFLUENCE DU ZINC SUR L'OXYDATION BIOLOGIQUE ET LE MÉTABOLISME DES GLUCIDES

Comme il est indiqué plus haut, depuis la découverte de Raulin ⁽²⁾ le zinc était considéré soit comme un élément « stimulant », soit comme un élément « accessoire ». Mais cette conception de stimulation n'explique ni le mécanisme ni le rôle actif que cet élément joue dans le monde organique.

L'idée de stimulation ne peut pas *expliquer* la spécificité de l'action du zinc sur la croissance de l'*Aspergillus*, ni l'effet de ce métal sur la croissance des rats et souris.

D'autre part, les travaux de G. Bertrand et de ses collaborateurs, exécutés pendant un quart de siècle, ont montré que la présence de tous ces éléments en quantités infinitésimales dans le monde vivant n'est pas sans signification. Leur présence est étroitement liée au métabolisme. Il est exact qu'on trouve ces éléments en quantités très petites et que l'effet produit par eux semble sans rapport avec leurs quantités et sans relation avec la loi d'action de masse. Pour ces raisons G. Bertrand a conclu que ces éléments ne doivent pas être engagés à titre définitif dans le métabolisme des tissus vivants, mais ils peuvent intervenir pour régler l'assimilation des substances banales qui, sans eux, ne seraient pas ou seraient mal assimilées, autrement dit, que l'action de tous ces éléments doit être catalytique.

Mais si ces éléments catalytiques exercent une action favorable en petites quantités, ils deviennent par contre nuisibles à forte dose. Pour traduire ces faits, G. Bertrand a formulé une loi qu'il a nommée la loi de l'optimum de concentration nutritive ⁽⁹²⁾, loi qui intervient en même temps dans les phénomènes d'assimilation que la loi du minimum due à Liebig.

Conformément à la première de ces lois, on observe que si une substance, comme le zinc, nécessaire au développement ou au fonctionnement d'un organisme, est donnée en quantités

croissantes, l'influence favorable augmente graduellement, arrive à un maximum, puis, selon la nature de la substance, diminue plus ou moins rapidement. La forme de cette courbe dépend de la nature de la substance. Avec quelques-unes, la courbe présente souvent un plateau assez étendu, tandis qu'avec d'autres elle monte et descend rapidement.

La connaissance de cette loi permet d'expliquer certaines confusions créées par des hypothèses comme celle de la « stimulation ».

Les auteurs qui ont considéré l'action des agents catalytiques seulement à fortes doses ont fixé leur attention sur la dernière partie des courbes représentant ces actions. Pour avoir une idée complète du rôle de ces agents, il faut considérer les courbes entières.

En ce qui concerne le zinc, considéré particulièrement du point de vue du métabolisme des glucides, on peut citer l'idée de Neuberg⁽⁹³⁾, qui a envisagé l'action d'un sel de ce métal sur la fermentation alcoolique comme une action stimulante seulement. Mais il est intéressant de noter, par contre, que Kostychew⁽⁹⁴⁾ a trouvé que le rôle du zinc dans le même processus est celui d'un catalyseur. Il a pensé que le zinc règle l'étape de la phosphorylation.

Colley⁽⁹⁵⁾ a montré que le zinc a une influence plus favorable sur la croissance de la bactérie *Pseudomonas tumefaciens*, cultivée dans un tube à essais étroit, que sur celle cultivée dans un milieu contenu dans une fiole de Erlenmeyer. Ce qui démontre que le zinc favorise l'oxydation.

Thunberg^(96, 97, 98) a signalé que le zinc augmente l'oxydation des extraits de quelques graines.

Tandis que Javillier⁽⁹⁹⁾, a noté que quand l'*Aspergillus niger* vit sur un milieu complet, il s'établit entre le poids de la récolte et le sucre consommé un rapport assez constant, qui change si l'on supprime cet élément du milieu. Dans ce dernier cas, la quantité de sucre consommée peut s'abaisser au-dessous du chiffre précédemment obtenu, mais généralement elle s'élève. Ainsi on voit l'absence de ce métal produire un défaut dans le mécanisme régulateur de la consommation de l'aliment carboné. Cet auteur a constaté que cela peut entraîner des variations de la valeur du quotient respiratoire, de l'abondance et de la nature des principes immédiats élaborés et des substances excrétées, et de la réaction du milieu de culture.

De son côté, Haas a constaté que, d'une part, les feuilles des

orangers qui manquent de zinc contiennent beaucoup plus de sucre réducteur que la quantité normale, et que, d'autre part, la teneur en sucre de ces feuilles traitées avec une petite quantité d'un sel de zinc diminue plus rapidement que celle des feuilles non traitées. Ce fait montre nettement que le zinc prend aussi part au métabolisme des glucides chez les plantes.

Reed et Dufrénoy^(100, 101) sont arrivés à la même conclusion en travaillant sur d'autres plantes.

Il ressort de toutes les considérations ci-dessus que le zinc ainsi que la vitamine B¹ participent catalytiquement au métabolisme des glucides. Le zinc augmente aussi la respiration des cellules. Dans le chapitre précédent, il a déjà été signalé que l'action de la vitamine B¹ était très modifiée par l'absence de zinc. Ce fait m'a amené à chercher s'il y a une action conjuguée de la vitamine B¹ et du zinc *in vitro* comme *in vivo*.

Il m'a semblé que le meilleur procédé pour arriver à ce but est de vérifier si le zinc modifie l'action de la vitamine B¹ sur les tissus avitaminosés.

Dans les travaux antérieurs sur le rôle catalytique de la vitamine B¹, on a toujours utilisé les tissus des pigeons avitaminés jusqu'au symptôme d'opisthotonos. Dans ce travail on a suivi la même technique. On a essayé d'abord d'avoir des pigeons avitaminés en B¹ et avec la teneur minima du zinc dans les tissus. Pour cela on a soumis les pigeons à un régime sans vitamine B¹ et exempt également de zinc. On a trouvé que, dans ces conditions, les pigeons deviennent malades, mais pas toujours avec les symptômes de paralysie. En même temps, on a été obligé de maintenir les pigeons pour ces expériences dans une cage où ils ne pouvaient pas trouver de zinc. Nous n'avons pas eu assez de cages de verre pour continuer les expériences de cette façon. Mais, après plusieurs tentatives, il a été trouvé qu'un tissu suspendu dans un milieu privé rigoureusement de zinc fonctionne comme un tissu sans zinc. Quand on met un tissu dans ce milieu, il y a un équilibre entre le tissu et les produits du tissu; le zinc du tissu diffuse dans le milieu, il se produit ainsi un partage entre le tissu et le milieu. Le tissu devient comparativement pauvre en zinc. Toutes les études de ces tissus dans ces conditions peuvent être considérées comme des études de tissus sans zinc.

Pour cette raison, dans ce travail, on a employé les pigeons avitaminés dans les conditions ordinaires et la respiration a été déterminée dans le milieu sans zinc et ainsi comparée avec celle qui a été déterminée dans un milieu avec zinc.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Appareil. — L'appareil employé au cours de ce travail était le manomètre de Warburg ⁽¹⁰²⁾. Comme on sait, l'absorption du gaz dans cet appareil est calculée par la formule :

$$x = hk, \quad (1)$$

où x = la quantité de gaz absorbée en centimètres cubes à la température et à la pression normales;

h = hauteur du liquide dans le manomètre;

et k = une constante.

Pourtant, Warburg ⁽¹⁰³⁾ a déjà montré que la valeur de k est exprimée par la formule

$$k = \frac{v_g + \frac{273}{T} v_F \alpha}{P_0} (2)$$

où v_g = le volume de gaz au-dessus du liquide dans le récipient;

v_F = le volume du liquide dans le récipient;

T = la température (absolue) du bain-marie;

P_0 = la pression initiale dans le récipient (qui est égale, en général, à la pression barométrique);

P = la pression normale, exprimée en millimètres, de fluide du manomètre;

α = le volume du gaz dissous dans un centimètre cube du liquide du récipient.

Par conséquent, on peut calculer la quantité de gaz absorbée si la valeur de k est connue. De la formule ⁽²⁾, on voit qu'on peut connaître la valeur de k pour une température définie si on connaît le volume du récipient à cette température. On peut y arriver par plusieurs méthodes. Dans ce travail on a employé la méthode de Warburg ⁽¹⁰³⁾, avec les modifications introduites par Jowett ⁽¹⁰⁴⁾ pour déterminer ce volume.

LES MILIEUX

La solution de Ringer. — La solution de Ringer était composée de :

NaCl	0,70	%
KCl.	0,018	%
CaCl.	0,019	%
NaHCO ₃	0,21	%

Les sels, chlorure de sodium, chlorure de potassium et chlorure de calcium, avaient été cristallisés d'abord d'une solution dans l'acide chlorhydrique concentré, afin de les débarrasser des traces de zinc, ensuite de l'eau bidistillée. Le bicarbonate employé était préparé par passage du gaz carbonique dans une solution de carbonate de sodium, suivi de plusieurs recristallisations. 100 cm³ de cette solution ne contiennent aucune trace de zinc.

La solution de Ringer-phosphate. — Cette solution, employée par Peter et ses collaborateurs (⁷¹), a été préparée de la façon suivante :

On a versé 200 cm³ d'une solution de KH² PO⁴ à 6,8 p. 100 dans un récipient contenant 786 cm³ d'une solution de Ringer. Puis on a introduit dans le mélange une quantité suffisante de NaOH (20 p. 100) pour amener le pH à 7,3. On a laissé reposer pendant la nuit, ensuite on a filtré.

Le phosphate de potassium employé avait été cristallisé plusieurs fois.

La solution de Ringer-phosphate-pyrophosphate. — La solution de Ringer-phosphate-pyrophosphate a été préparée par addition de pyrophosphate de sodium recristallisé pur, de manière à avoir une concentration de ce sel de 0,01 M dans la solution de Ringer-phosphate.

L'acide lactique. — L'acide lactique pur provenant du commerce a été purifié d'abord par la distillation dans le vide, ensuite par la formation du sel de zinc d'après la méthode de Meyerhof (¹⁰⁵). L'acide lactique obtenu par ce procédé a été transformé en sel de sodium et cristallisé à plusieurs reprises dans un mélange d'alcool et d'éther. Le lactate de sodium ainsi obtenu était absolument exempt de toute trace de zinc. Il était conservé dans un dessiccateur sous vide.

L'acide pyruvique. — L'acide pyruvique a été préparé par la méthode ordinaire et purifié plusieurs fois par distillation dans le vide. L'acide qu'on obtient ainsi est pur et cristallise facilement par refroidissement. Il a été conservé à l'état solide dans la glace. On a employé 0,02 M de cet acide en solution tamponnée. On a neutralisé l'acide jusqu'à pH 7,3 avec une quantité suffisante de soude au moment de l'employer.

TISSUS

Les pigeons utilisés au cours de ce travail étaient des pigeons adultes ordinaires et non voyageurs, provenant du commerce. Avant de les mettre au régime avitaminé, on les a nourris pendant quatre semaines avec un régime de blé, de maïs et de sarrasin, comme il a déjà été décrit. Après ce laps de temps, on les a soumis au régime du riz poli préparé par la même méthode qu'auparavant. En outre, on leur a donné le mélange salin de G. Bertrand et Bhattacharya, 2 gouttes d'huile de foie de morue tous les deux jours, ainsi que 2 gr. de poudre de viande exempte de vitamine B¹ par jour. Les pigeons étaient logés dans des cages de fer.

Tous les pigeons atteints de symptômes d'opisthotonos bien nets ont été décapités, chaque cerveau était alors disséqué et toutes ses parties, sauf les cervelets, prélevées et mises sur une plaque maintenue à la température de 37° C. On en a fait un mélange homogène avec une spatule d'os, et on a prélevé des portions d'environ 50 mg. de ce mélange qu'on a placées dans les récipients de l'appareil de Warburg contenant déjà les solutions tampons, les solutions de Ringer-phosphate-pyrophosphate et, quand il y avait lieu, la vitamine B¹ et les solutions de sulfate de zinc. Le sulfate de zinc avait été préparé à partir du zinc pur (R. P., en pastilles procédé G. Bertrand pour analyses). La vitamine B¹ était employée sous forme de cristaux, obtenus par la méthode de Kinnersley, Peter et Reader (²⁷). La quantité de solution tampon employée dans chaque récipient était de 3,0 cm³. Quand on a utilisé la vitamine, on a introduit seulement 2,9 cm³ de la solution tampon et mélangé avec 0,1 cm³ d'une solution convenable de chlorhydrate de vitamine B¹. De même, quand on a employé le zinc, on a remplacé 0,1 cm³ de la solution tampon par un volume égal de solution de sulfate de zinc titrée.

Les récipients sont pesés avant et après l'introduction des tissus. Ensuite on introduit dans les tubes d'absorption, contenant 0,4 cm³ de soude, un rouleau de papier filtre. On triture les morceaux de tissu dans les récipients avec des baguettes de verre, puis on fixe les récipients aux manomètres et on les place dans un thermostat à 37° C. On les agite pendant dix minutes, on ouvre les robinets, afin d'égaliser la pression, et on les ferme à nouveau. On lit alors la première fois, puis on répète les lectures toutes les quinze minutes.

TABEAU I

ABSORPTION D'OXYGÈNE EN mm³, PAR LES CERVEAUX
DES PIGEONS AVITAMINÉS EN PRÉSENCE DU ZINC
ET DE VITAMINE B¹

Absorption de O₂ en mm³/gr./hr. pour chaque période de trente minutes.

EXPÉRIENCE 1.

Périodes en minutes . . .	0' à 30'	30' à 60'	60' à 90'	90' à 120'
L	1031	910	618	476
L+V.	1120	1001	765	525
L+Zn (2,0 γ)	1065	985	722	580
L+V+Zn (2,0 γ).	1365	1286	1013	930

EXPÉRIENCE 2.

L	958	800	550	421
L+V.	1011	926	613	500
L+Zn (2,0 γ)	945	818	532	411
L+V+Zn (2,0 γ).	1286	1120	981	870

EXPÉRIENCE 3.

L.	1121	1001	753	456
L+V.	1235	1100	832	465
L+Zn (2,0 γ)	1156	1089	822	582
L+V+Zn (2,0 γ).	1422	1315	1059	911

EXPÉRIENCE 4.

L.	812	685	426	310
L+V.	921	712	601	423
L+Zn (2,0 γ)	811	626	520	385
L+V+Zn (2,0 γ).	1102	992	754	609

EXPÉRIENCE 5.

L.	869	713	480	325
L+V.	888	725	513	351
L+Zn (1,0 γ)	873	751	521	343
L+V+Zn (1,0 γ).	935	820	612	413

EXPÉRIENCE 6.

L.	1123	926	618	421
L+V.	1250	981	714	427
L+Zn (1,0 γ)	1120	939	728	512
L+V+Zn (1,0 γ).	1250	1086	818	629

où L, acide lactique à 0,003 M.

V, chlorhydrate de vitamine B¹ cristallisée, 2,5 γ.

Zn, sulfate de zinc à 2,0 γ pour les expériences 1 à 4 et 1,0 γ pour les expériences 5 et 6.

Les expériences étaient faites dans le milieu de Ringer-phosphate-pyrophosphate.

TABLEAU II

EXPÉRIENCES AVEC L'ACIDE PYRUVIQUE
COMME SUBSTRAT

L'absorption d'oxygène par le cerveau des pigeons avitaminés en présence du zinc et de la vitamine B¹.

Absorption de O² en mm³/gr./hr.

EXPÉRIENCE 1.

Périodes en minutes . .	0' à 30'	30' à 60'	60' à 90'	90' à 120'
P.	1158	921	711	410
P+V.	1201	1041	742	501
P+Zn (2,0 γ)	1188	987	732	432
P+V+Zn (2,0 γ).	1391	1122	950	712

EXPÉRIENCE 2.

P.	822	641	423	311
P+V.	881	680	450	290
P+Zn (2,0 γ)	841	683	468	301
P+V+Zn (2,0 γ).	1025	822	652	421

EXPÉRIENCE 3.

P.	912	705	541	418
P+V.	980	818	625	426
P+V+Zn (2,0 γ).	972	868	671	535
P+V+Zn (2,0 γ).	1201	1106	968	721

EXPÉRIENCE 4.

P.	1012	815	601	477
P+V.	968	792	585	410
P+Zn (2,0 γ)	1023	815	601	479
P+V+Zn (2,0 γ).	1317	1140	933	853

Absorption de O² en mm³/gr./hr.

EXPÉRIENCE 5.

Périodes en minutes . .	0' à 30'	30' à 60'	60' à 90'	90' à 120'
P.	818	640	479	311
P+V.	832	672	501	316
P+Zn (1,0 γ)	856	661	484	285
P+V+Zn (1,0 γ).	1069	845	632	429

EXPÉRIENCE 6.

P.	1022	858	621	432
P+V.	1100	911	683	451
P+Zn (1,0 γ)	1085	861	671	450
P+V+Zn (1,0 γ).	1153	971	815	623

P, acide pyruvique à 0,02 M.

V, chlorhydrate de vitamine B¹ à 2,5 γ.

Zn, sulfate de zinc à la concentration indiquée.

Absorption de O² par le cerveau de pigeon ordinaire.

Absorption de O² en mm³/gr./hr.

EXPÉRIENCE 1.

Périodes en minutes . .	0' à 30'	30' à 60'	60' à 90'	90' à 120'
L.	1015	822	613	459
L+V.	1022	850	643	470
L+Zn (2,0 γ)	1168	1050	800	560
L+V+Zn (2,0 γ).	1180	1028	811	580

EXPÉRIENCE 2.

L.	992	753	512	352
L+V.	1098	823	680	490
L+X Zn (2,0 γ)	1132	942	765	522
L+V+Zn (2,0 γ).	1150	980	770	530

EXPÉRIENCE 3.

P.	1112	922	741	512
P+V.	1208	1065	852	544
P+Zn (1,0 γ)	1312	1105	946	733
P+V+Zn (1,0 γ).	1342	1149	1001	735

EXPÉRIENCE 4.

P.	712	522	312	298
P+V.	785	604	421	301
P+Zn (1,0 γ)	985	741	590	312
P+V+Zn (1,0 γ).	999	765	613	350

où L, acide lactique à 0,033 M.

P, acide pyruvique à 0,02 M.

V, chlorhydrate de vitamine B¹, 2,5 γ.

Zn, sulfate de zinc.

Tandis que j'étais occupé aux recherches mentionnées dans ce chapitre, Rydin (¹⁰⁶), en se servant de la technique de Thunberg, a publié un mémoire sur la respiration des tissus avitaminés. Je

n'ai pas pu me procurer le mémoire original. Mais, d'après le sommaire paru dans *Chemical Abstracts* ⁽¹⁰⁷⁾, il apparaît que cet auteur a réussi à montrer que le phénomène de l'affaiblissement d'absorption d'oxygène par les tissus des pigeons avitaminés est compliqué par les effets dus à l'inanition. Cependant, dans tous les travaux sur l'action de la vitamine B¹ *in vitro*, il est absolument nécessaire de réaliser les conditions qui ne provoquent pas cette complication.

Dans les chapitres précédents, il a été indiqué que plusieurs chercheurs ont constaté que les pigeons ont besoin des vitamines B¹, B³ et B⁵, à côté des vitamines liposolubles, pour pouvoir se développer normalement avec un régime de riz additionné de protéides.

Il est bien connu que les pigeons ont une aversion pour le régime de riz seul pendant la dernière étape de l'avitaminose; il en résulte une inanition complète. On voit donc que le phénomène observé dans les tissus de ces animaux provoqué par le manque de vitamines est superposé au manque d'autres substances. Le régime au riz poli seul prive les pigeons d'autres produits, comme protéides, sels, etc.

Pour remédier à ces difficultés, Suigara et Benedict ⁽¹⁰⁸⁾ ont constitué un régime synthétique composé de farine, de sucre, d'agar-agar, etc., qui contient par conséquent des glucides, des protéides, des sels, etc., nécessaires à la nutrition normale des pigeons.

Ils ont montré qu'avec cette alimentation additionnée de vitamines les pigeons se portent bien. La seule difficulté, et elle n'est pas négligeable, est qu'on est obligé de donner cette alimentation par gavage, parce que les pigeons n'en mangent pas volontairement. Il faut donc s'assurer que la quantité d'aliments fournie aux pigeons est suffisante pour leur apporter un minimum de calories.

Dans le même but, on a essayé d'autres alimentations synthétiques. C'est ainsi que Randoin et Simonet ⁽¹²⁾ ont indiqué un régime qui a l'avantage de carencer les pigeons en vitamine, mais sans provoquer d'autres complications. Drummond et Marrian ⁽¹⁰⁹⁾ ont indiqué un autre régime comportant les mêmes avantages.

J'ai essayé ce dernier régime au cours de ce travail pour vérifier si les phénomènes observés dans les tissus avitaminés avec ce régime sont les mêmes que ceux déjà signalés.

Comme avant, ce sont les pigeons malades, atteints d'opis-

thotonos, qui ont été utilisés pour les études de respiration. Ces pigeons n'avaient pas perdu beaucoup de leur poids initial au moment où ils étaient atteints d'avitaminose; ainsi, les phénomènes observés dans leurs tissus n'ont pas été modifiés par d'autres facteurs, comme ceux d'inanition, etc.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Animal. — Comme précédemment, j'ai choisi des pigeons adultes et je les ai soumis pendant quatre semaines à un régime de blé, de maïs, etc., avant de les mettre au régime sans vitamines, composé comme suit :

Amidon de riz . . .	60 %	Beurre	4 %
Caséine	16 %	Cellulose	2 %
Agar-agar	12 %	Mélange salin	4 %

(G. Bertrand et Bhattacharya)

Les pigeons étaient nourris chaque jour par gavage avec un tube, et quand ils ont montré les symptômes d'opisthotonos, on les a décapités, on a enlevé le cerveau et on a étudié leur respiration par la méthode indiquée plus haut.

TABLEAU IV

ABSORPTION D'OXYGÈNE PAR LE CERVEAU DE PIGEON AVITAMINÉ

Le dosage était fait dans un milieu de Ringer-phosphate-pyrophosphate, mais les sels composant ce milieu n'avaient pas été purifiés. Ils contenaient donc des traces de zinc.

Absorption de O² en mm³/gr./hr.

Périodes en minutes . .	0' à 30'	30' à 60'	60' à 90'	90' à 120'
L.	1121	932	712	482
L+V.	1312	1122	950	729
P.	985	746	529	313
P+V.	1101	960	740	510

où L, acide lactique à 0,033 M.

P, acide pyruvique à 0,02 M.

V, chlorhydrate de vitamine B¹, 2,5 γ.

TABLEAU V

Dans ces expériences j'ai employé des sels purifiés pour préparer le milieu de Ringer-phosphate-pyrophosphate.

Absorption de O₂ en mm³/gr./hr.

EXPÉRIENCE 1.

Périodes en minutes . .	0' à 30'	30' à 60'	60' à 90'	90' à 120'
L.	1053	823	611	420
L+V.	1072	850	650	449
L+Zn (2,0 γ)	1043	792	623	411
L+V+Zn (2,0 γ). . . .	1280	1029	817	625

EXPÉRIENCE 2.

P.	889	723	523	351
P+V.	901	753	535	366
P+Zn (2,0 γ)	912	753	543	412
P+V+Zn (2,0 γ). . . .	1050	942	716	519

où L, acide lactique à 0,033 M.

P, acide pyruvique à 0,02 M.

V, chlorhydrate de vitamine B¹, 2,5 γ.

Zn, sulfate de zinc.

On peut conclure de ces résultats que le phénomène observé chez les pigeons avitaminés par un régime de riz poli est bien lié au manque de vitamine B¹ et que l'inanition n'est pas la cause principale de ce phénomène. L'action du zinc est nette avec le tissu des pigeons qui n'étaient pas affamés.

*Effet du zinc sur l'oxydation de l'acide pyruvique
par les tissus avitaminés.*

Comme nous l'avons vu plus haut, il y a une augmentation de la respiration des tissus avitaminés en présence de vitamine B¹, de l'acide pyruvique et du zinc, tandis qu'en l'absence de ce métal l'augmentation est très faible. J'ai voulu me rendre compte si cette augmentation était en rapport avec une quantité correspondante d'acide pyruvique oxydé.

Dans ce but, je me suis servi de l'appareil de Warburg mentionné dans les expériences précédentes. J'ai employé les tissus de pigeons avitaminés comme avant. Les pigeons avaient été nourris avec du riz seul pour les avitaminer.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les pigeons avitaminés, atteints d'opisthotonos, étaient décapités, le cerveau enlevé et mélangé comme auparavant à 37° C.

On a placé 100 à 120 mg. de tissu dans chaque récipient déjà rempli avec la solution de Ringer-phosphate-pyrophosphate, contenant en outre l'acide pyruvique (0,01 M) et la vitamine B¹ cristallisée (2,5 γ). J'ai employé chaque fois six récipients. Les deux premiers, qui ne contenaient pas de tissu, fonctionnaient comme baromètres; les deux suivants contenaient le tissu dans la solution tampon et la vitamine B¹; les deux derniers, les tissus, la solution tampon, la vitamine B¹ et 2,0 γ de zinc, sous forme de sulfate.

On a agité les appareils, une fois garnis, dans un thermostat à 37° C. pendant une demi-heure. Ensuite on les a enlevés et on a ajouté à chacun 1,0 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100. On a versé les tissus avec la solution du premier récipient dans un mortier et on les a broyés. On a décanté la solution dans un tube à centrifuger. On a ajouté de nouveau 3 cm³ de solution d'acide trichloracétique à 4 p. 100 et on a broyé une deuxième fois. On a décanté. On a répété cette opération une troisième fois. La solution d'acide trichloracétique ainsi obtenue a été centrifugée. On a traité le liquide décanté avec de la soude afin d'amener le pH à 2,0. On a complété le volume de ce liquide à 20 cm³. Ainsi, pour chaque récipient, on a pu avoir une solution. On a déterminé alors la quantité d'acide pyruvique restant dans ces solutions par la méthode de Case (¹¹⁰).

Pour cela, on en a mélangé 5 cm³ avec 0,5 cm³ d'une solution de bisulfite de sodium (1 M) et on a laissé reposer quelques minutes (15 minutes environ). On a neutralisé l'excès de bisulfite avec une solution d'iode (N/10), puis avec une autre de N/100. On a décomposé la combinaison bisulfitique formée par le carbonate saturé et on a déterminé la quantité de sulfate libérée avec de l'iode (N/100).

Les résultats sont présentés dans le tableau suivant.

TABLEAU VI
EFFET DE LA VITAMINE ET DU ZINC SUR LA DÉCOMPOSITION
DE L'ACIDE PYRUVIQUE PAR LES TISSUS AVITAMINÉS

	Conc. initiales de l'acide pyruvique en mg. par gr. de tissu.	Quantité d'acide pyruvique restant après la respiration en présence de la vitamine B ¹ En mg./gr. tissu		Différences
		Sans zinc	Avec zinc	
1	25,0 mg.	7,2 mg.	6,5 mg.	0,7 mg.
2	29,0 —	8,1 —	6,9 —	1,2 —
3	33,0 —	9,2 —	7,5 —	1,7 —
4	18,0 —	5,4 —	4,8 —	0,6 —
5	23,0 —	6,5 —	6,3 —	0,2 —

Ces résultats montrent qu'il reste moins d'acide pyruvique en présence de zinc, c'est-à-dire que le pouvoir catalytique de la vitamine B¹ est beaucoup diminué en l'absence de ce métal. En somme, il résulte donc de ces expériences que le zinc à faible dose favorise l'absorption d'oxygène par les tissus avitaminés, ainsi que la disparition de l'acide pyruvique. On peut expliquer cette action conjuguée soit par formation d'un composé de zinc et de la vitamine B¹, soit par une action individuelle sur la même réaction. Mais il est également possible que ces deux substances réagissent individuellement sur différentes phases d'une série de réactions amenant l'oxydation de l'acide pyruvique ou la respiration des tissus en présence d'acide pyruvique.

VI

INFLUENCE DU ZINC SUR LA RESPIRATION ET LA GLYCOLYSE DES TISSUS

La diffusion du zinc dans le monde vivant est de connaissance assez récente. La présence générale de cet élément dans les tissus des animaux, dans leurs humeurs et dans leurs produits d'excrétion, pouvait, à première vue, être interprétée comme accidentelle et s'expliquer par le fait que les aliments naturels apportent aux animaux un contingent appréciable de ce métal, qui y était retenu, sans toutefois participer aux fonctions physiologiques. En effet, cette interprétation de la présence du zinc dans le monde vivant dominait avant la publication des travaux de l'école moderne.

G. Bertrand et ses collaborateurs ont été les premiers à montrer le rapport intime qui existe entre ce métal et le métabolisme de divers tissus des animaux.

Récemment, Warburg ⁽¹¹¹⁾ a établi l'importance de la respiration et de la glycolyse des tissus et spécialement des tissus malins. Cet auteur a trouvé que la glycolyse anaérobie est relativement petite dans la plupart des tissus adultes; elle n'est importante que dans la substance grise du cerveau, dans les leucocytes, et surtout dans la rétine. D'une façon générale, la glycolyse anaérobie est très élevée dans les tissus en voie de croissance. Ainsi la glycolyse des tumeurs malignes est très grande. Mais, par contre, la glycolyse aérobie, en quantité appréciable, n'existe pas, sauf dans le cas des tumeurs malignes. La glycolyse aérobie est toujours moins élevée que la glycolyse anaérobie et la respiration a le pouvoir de diminuer la glycolyse en quantité proportionnelle à sa grandeur. Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Pasteur.

Tous ces résultats ont été vérifiés *in vitro* par Rona et Deutsch ⁽¹¹²⁾ et par Murphy et Hawkins ⁽¹¹³⁾. *In vivo*, ils ont été confirmés par les travaux de Todemuna, Hoda et Homma ⁽¹¹⁴⁾, Cori et Cori ⁽¹¹⁵⁾, et ceux de Warburg, Wind et Nagelein ⁽¹¹⁶⁾.

D'après Cristol (¹¹⁷), la teneur élevée en zinc des tissus cancéreux est fonction de la prolifération et de l'activité cellulaires. Ces faits l'ont amené à penser que le zinc jouerait dans les tissus cancéreux soit le rôle d'un catalyseur de quelques diastases, soit celui d'un coferment en combinaison avec des substances inconnues.

En étudiant l'action de quelques sels métalliques sur la glycolyse des tissus, Brooks et Jowett (¹¹⁸) ont trouvé que le sulfate de zinc, à la concentration de M/5000, a un effet inhibiteur et, pour cette raison, n'ont pas poussé plus loin leurs recherches avec ce métal.

Mais nous savons par les travaux de G. Bertrand (¹¹⁹) et de Javillier (¹²⁴) que l'action du zinc varie beaucoup selon la concentration.

Ces considérations m'ont amené à étudier l'influence du sel de zinc à diverses concentrations sur la respiration et sur la glycolyse de quelques tissus.

Appareil. — L'appareil utilisé était le même que celui mentionné dans le chapitre précédent. J'ai employé huit manomètres à la fois.

Tissus. — Les tissus employés au cours de cette recherche étaient ceux de rats. On a divisé les tissus avec un rasoir en petits morceaux d'une épaisseur de 0,3-0,4 mm. On les a placés dans une solution de Ringer quelques minutes avant de les mettre dans les solutions des récipients de Warburg. Après les expériences, on a desséché les tissus à l'étuve à 105° C. pour avoir leur poids sec. La quantité de tissu employée dans chaque récipient était de 20 à 40 mg. environ.

Milieu. — Pour la respiration j'ai employé le milieu de Locke contenant 2 p. 100 de glucose et composé des sels suivants :

NaCl	0,158 M	par litre.
KCl	0,0033 M	—
CaCl	0,0023 M	—

Tous les sels employés étaient auparavant recristallisés pour les débarrasser des traces de zinc contenues dans les produits purs du commerce. La pureté de ces sels était vérifiée par l'analyse. Avant de préparer le milieu ci-dessus, j'ai préparé une solution un peu plus concentrée, de telle façon que 2,9 cm³ de cette nouvelle solution ajoutés à 0,1 cm³ d'eau donnent la solution de Locke. Cette solution concentrée était saturée par de l'oxygène

contenant 5 p. 100 de gaz carbonique. Ce dernier forme la phase gazeuse au-dessus du milieu au cours des expériences. Le pH de la solution était 7,3. Dans les expériences où l'on a ajouté le zinc, 0,1 cm³ de cette solution était remplacé par un volume égal d'une solution de sulfate de zinc. Aux concentrations très faibles, cette addition ne produit aucun changement appréciable du pH de milieu. Mais avec les concentrations supérieures, on doit ajuster le pH à pH 7,3 en ajoutant une quantité suffisante d'une solution de soude.

Le sulfate de zinc employé dans cette expérience était préparé à partir du zinc pur (procédé G. Bertrand) existant dans le commerce.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Pour déterminer la respiration des tissus, j'ai employé huit manomètres de Warburg. On met dans les récipients 2,9 cm³ d'une solution de Locke concentrée, et 0,1 cm³ d'eau. Dans les expériences avec le zinc, on a ajouté, au lieu d'eau, 0,1 cm³ d'une solution titrée de sulfate de zinc.

On introduit les tissus dans cette solution et on fixe les récipients aux manomètres. Ensuite on met les appareils dans un thermostat et on agite. En agitant, on remplit les récipients avec de l'oxygène.

On continue à agiter pendant dix minutes pour équilibrer la température. Puis on commence les lectures, une toutes les quinze minutes, pendant deux heures.

Pour absorber le gaz carbonique qui se dégage pendant la respiration, j'ai employé des rouleaux de papier filtre mouillé avec une solution de soude à 20 p. 100. Après l'expérience, on enlève les tissus, on lave avec de l'eau bidistillée et l'on sèche à 105° C. On calcule le Q_{O_2} (*i. e.* millimètre cube d'oxygène absorbé par milligramme de tissu sec par heure) en partant des chiffres obtenus après les quinze premières minutes.

Voici les résultats (tableau I) :

TABLEAU I
RESPIRATION DES TISSUS EN PRÉSENCE DE ZINC

Tissus	Concentrations en zinc.											
	1×10^{-4}	1×10^{-5}	1×10^{-6}	1×10^{-7}	1×10^{-8}	1×10^{-9}	1×10^{-10}	1×10^{-11}	1×10^{-12}	1×10^{-13}		
Foie	Qo ² 8,3	Qo ² 8,6	Qo ² 10,2	Qo ² 11,6	Qo ² 11,4	Qo ² 10,3	Qo ² 9,2	Qo ² 8,6	Qo ² 8,7	Qo ² 8,2		
—	9,0	9,3	10,8	10,2	9,8	—	9,5	—	—	8,5		
—	11,0	11,5	12,0	11,8	10,8	—	—	8,3	—	8,5		
—	7,2	—	7,8	8,6	9,5	9,3	9,0	—	—	7,3		
Rein	15,3	16,0	—	17,0	17,5	—	16,5	—	—	16,0		
—	16,8	16,8	17,5	18,2	17,6	19,0	—	—	—	16,0		
—	18,2	19,5	20,2	19,6	—	19,0	—	—	—	18,0		
—	21,5	21,3	21,7	22,9	21,5	21,0	21,0	21,1	—	21,0		
Testicule . . .	10,4	10,0	10,6	11,1	11,0	10,9	10,8	10,2	—	10,0		
—	7,6	7,9	7,9	8,0	8,3	—	8,0	—	—	7,5		
—	6,0	6,3	6,3	6,5	6,1	—	6,1	—	—	5,8		
—	8,0	8,9	8,9	—	10,0	9,6	9,7	—	—	8,2		
—	8,5	8,8	8,8	10,3	10,7	10,2	—	9,5	—	8,6		

Les valeurs de Qo² étaient calculées avec les chiffres obtenus pendant les premières quarante minutes de la respiration *in vitro*.

GLYCOLYSE

Pour la glycolyse anaérobie, la solution de Ringer contenant 0,2 p. 100 de glucose était employée. La composition de cette solution était la suivante :

NaCl	0,70 %
KCl	0,018 %
CaCl	0,019 %
NaHCO ³	0,21 %

Tous les sels étaient rigoureusement débarrassés de toute trace de zinc. Le glucose était également purifié par dissolution dans l'eau bidistillée et précipitation par un excès d'alcool. Le premier précipité était rejeté parce qu'il contenait la plupart des impuretés minérales. On a répété cette opération jusqu'à ce qu'on obtint le glucose absolument pur.

TABLEAU I

VALEURS DE LA GLYCOLYSE POUR DIVERS TISSUS

Le sel de zinc employé était le sulfate.

Les chiffres de glycolyse donnés ici sont calculés d'après les chiffres obtenus par la respiration pendant les quarante premières minutes.

Tissus	N ² Qo ² sans zinc	N ² Qo ² avec zinc	
		Concentration de Zn employée	
		1 × 10 ⁻⁶	1 × 10 ⁻⁸
Foie	1,8	2,3	2,4
—	2,1	2,2	2,6
—	2,5	2,8	3,2
—	3,1	3,6	3,5
—	2,0	2,7	2,8
—	1,5	1,8	1,9
Rein	2,3	2,4	2,6
—	2,8	3,1	3,2
—	3,5	4,2	4,1
—	1,4	2,6	2,8
—	1,5	1,5	1,7
—	2,1	2,2	2,3
Moyenne.	2,1	2,6	2,8

Tissus	N ² QO ² sans zinc	N ² QO ² avec Zinc	
		Concentration de Zn employée	
		1×10^{-6}	1×10^{-8}
Testicule . .	5,2	7,4	7,5
— . .	7,4	8,0	8,6
— . .	7,2	8,9	9,1
— . .	6,1	6,9	7,3
— . .	7,3	8,0	8,5
— . .	7,5	8,8	9,3
Moyenne.	6,8	8,0	8,3

Dans la littérature scientifique il n'y a pas beaucoup de travaux relatifs à l'effet des métaux sur la respiration des tissus. Les travaux publiés à ce sujet concernent pour la plupart d'autres métaux, Na, K, Ca, Mg, Rb, Cs (¹²⁰). Kisch (¹²¹) a ajouté à cette liste le Bo et l'Al.

De nos résultats, nous voyons que le zinc augmente la respiration des tissus à de très faibles concentrations. Krebs (¹²³) a indiqué que le zinc a une action dépressive sur les succinoxydase et phénylène diamine oxydase des muscles. Mais la concentration de zinc employée dans cette expérience est comparativement élevée, et les conditions de l'expérience sont différentes de celles que nous avons employées dans l'expérience présente. Andreicheva (¹²³) a montré que l'action du zinc sur plusieurs diastases dépend beaucoup de la concentration employée. Il y a une concentration optima pour chaque diastase étudiée. Javillier (¹²¹) était arrivé aux mêmes conclusions dans ses expériences avec l'*Aspergillus*. On est là en présence d'un cas particulier : l'application de la loi plus générale formulée par G. Bertrand (^{92, 119}).

En ce qui concerne la glycolyse, nos expériences montrent que, sauf lorsqu'il s'agit du testicule, le zinc a une très faible action. Dans le cas du testicule, l'absence du zinc diminue sensiblement la glycolyse, ce qui indique que ce métal a une part spécifique dans le métabolisme de l'organe. Il est intéressant de noter que G. Bertrand a déjà indiqué que ce métal doit jouer un rôle important dans le métabolisme de cet organe (¹⁵).

VII

CONCLUSIONS

En étudiant l'élimination du zinc par les pigeons, nous avons constaté que, normalement, la quantité éliminée est égale à la quantité consommée. Si cependant on augmente la quantité consommée, au début, la quantité éliminée est moindre que la quantité consommée, mais, après quelques jours, cette différence disparaît et les deux grandeurs deviennent égales.

Dans le cas de pigeons nourris avec du riz et un mélange salin seulement, les résultats sont différents. Au début, il y a un grand excès d'élimination du métal sur la quantité consommée, mais cette différence disparaît en quelques jours. Plus tard, avec le progrès de l'avitaminose, l'excès d'élimination réapparaît et demeure jusqu'au moment où le pigeon devient malade. La présence ou l'absence de zinc dans le mélange salin ne change pas le caractère général de ce phénomène. Ainsi, on peut constater que l'élimination du zinc est étroitement liée à toutes les dégénérescences cellulaires de l'avitaminose.

En étudiant l'action du zinc sur la croissance du pigeon, nous avons trouvé que la présence de ce métal dans le régime est nécessaire au métabolisme normal de cet oiseau. Le pigeon nourri avec du riz et des sels privés de zinc et, en outre, des vitamines, ne peut pas maintenir son poids, mais il peut le faire si on ajoute une petite quantité d'un sel de zinc à ce régime.

Ainsi, le pigeon qui a perdu de son poids initial avec un régime avitaminé ne peut pas récupérer ce poids avec un régime privé de zinc, malgré la présence de toutes les vitamines nécessaires. La présence du zinc est pour cela indispensable.

Également, les pigeons qui peuvent maintenir leur poids à un niveau intermédiaire entre le poids maximum et le poids minimum quand on leur donne les extraits (X) et (Y) de levure préparés par la méthode de Peter et ses collaborateurs, ne le peuvent faire si on supprime tout le zinc de leur régime alimentaire.

Le pigeon qui a perdu de son poids avec un régime de riz poli, de vitamines et de mélange salin privé de zinc, peut recouvrer cette perte si on ajoute du zinc à ce régime. Ainsi, une chute de poids peut, grâce au zinc, se transformer en une augmentation.

Dans tous ces cas, l'action du zinc ressemble à celle de la vitamine B². Mais j'ai pu reconnaître par de nouveaux essais que le zinc n'est pas identique à cette vitamine.

En résumé, tous les résultats de mes expériences *in vivo* montrent que le zinc est essentiel au métabolisme normal des pigeons, et que l'action du zinc est liée en quelque façon à celle de la vitamine B¹.

* * *

J'ai étudié aussi l'action conjuguée de la vitamine B¹ et du zinc *in vitro*; j'ai trouvé que la vitamine B¹ ne peut agir catalytiquement sur la respiration d'un tissu avitaminé suspendu dans un milieu privé de zinc et contenant comme substrat de l'acide lactique ou de l'acide pyruvique, mais que l'action catalytique apparaît si on ajoute une petite quantité de zinc à ce milieu; alors, la respiration augmente. L'addition de zinc sans addition de vitamine B¹ ne change pas sensiblement la respiration initiale.

Dans les mêmes conditions, la respiration d'un tissu normal dans un milieu privé de zinc est beaucoup élevée en ajoutant le zinc. Ces expériences montrent que l'action du zinc et de la vitamine est soit une action conjuguée sur la même réaction, soit une action individuelle sur les mêmes ou différentes réactions.

J'ai également trouvé que l'action catalytique de la vitamine B¹ sur le métabolisme de l'acide pyruvique par les tissus avitaminés est sensiblement augmentée par l'addition de zinc. Tous ces résultats prouvent que le zinc et la vitamine B¹ sont nécessaires à la fois au métabolisme glucidique des tissus.

Dans le cas des tissus ordinaires, j'ai trouvé que l'action du zinc diffère selon la concentration. A une concentration très faible, de moins de 10^{-13} , le zinc n'a aucune influence sur la respiration; entre les concentrations 10^{-12} et 10^{-5} , le zinc a une action catalytique variable avec la concentration, tandis qu'à toutes les concentrations supérieures à 10^{-4} , le zinc a une action toxique.

En étudiant la glycolyse, j'ai vu que, aux concentrations de zinc étudiées, 10^{-6} et 10^{-8} , elle est insignifiante pour tous les tissus, sauf pour les testicules. Dans ce dernier cas, le zinc augmente sensiblement la glycolyse, démontrant que ce métal joue un rôle spécifique dans le métabolisme de l'organe. C'est aussi le cas de certaines recherches récentes, en particulier celles de Maxwell (¹²⁵, ¹²⁶). Ces dernières expériences sont significatives et confirment la conception de G. Bertrand sur l'importance du zinc dans le cycle reproductif.

Figure 3.

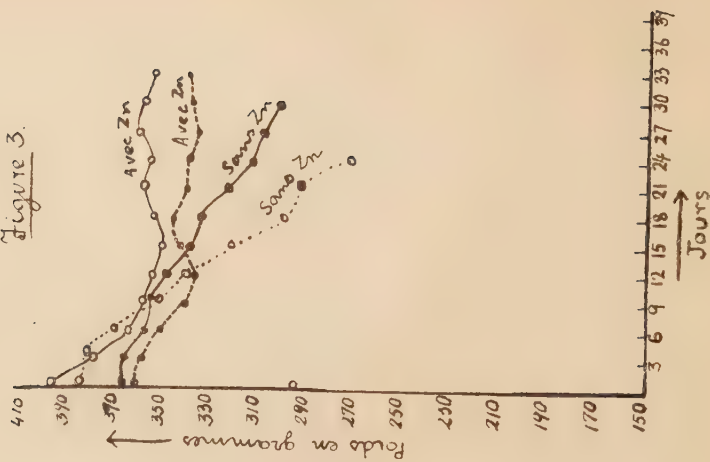


Figure 2.

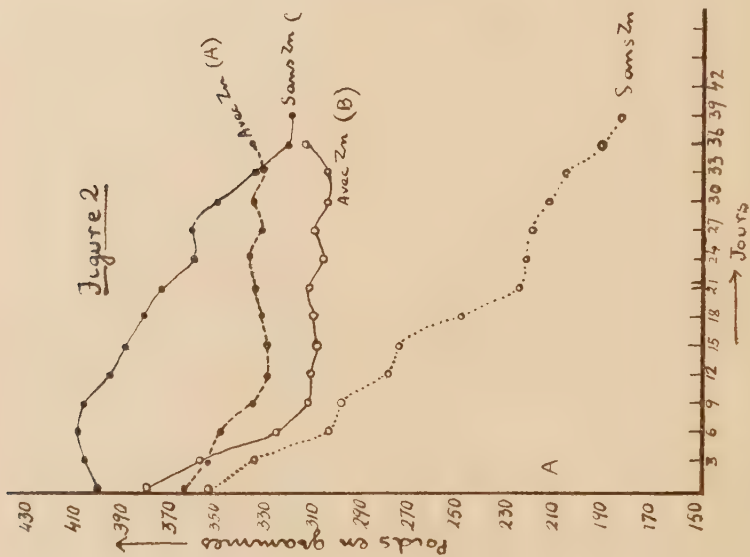
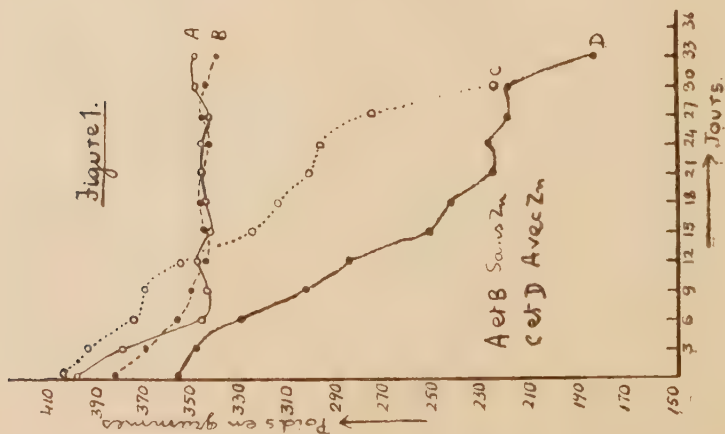
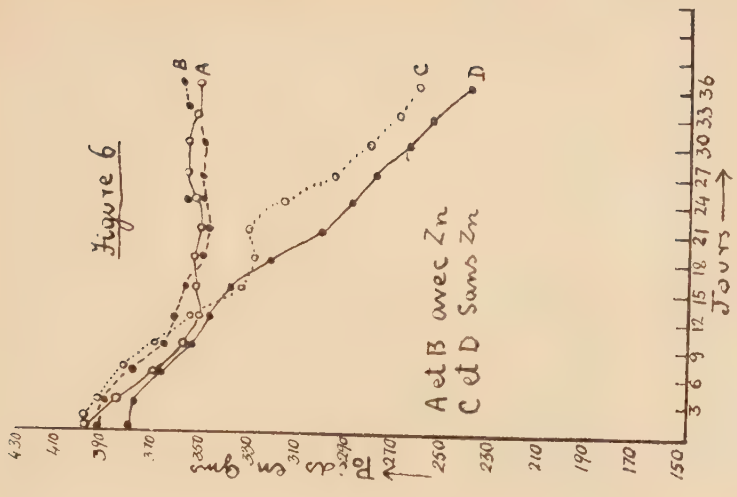
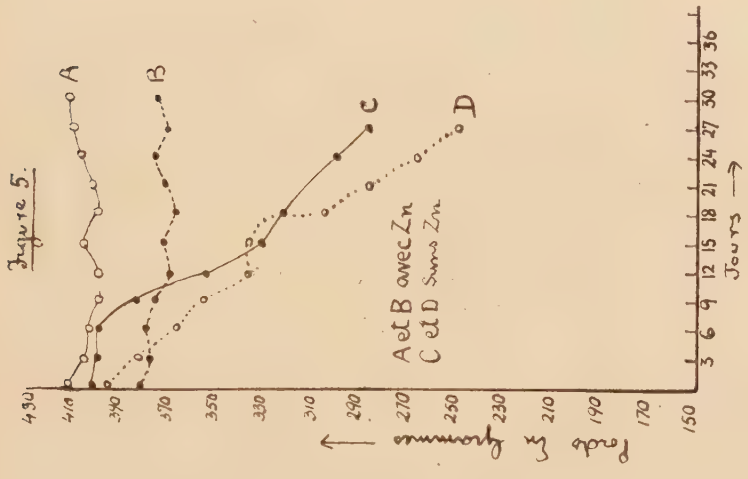
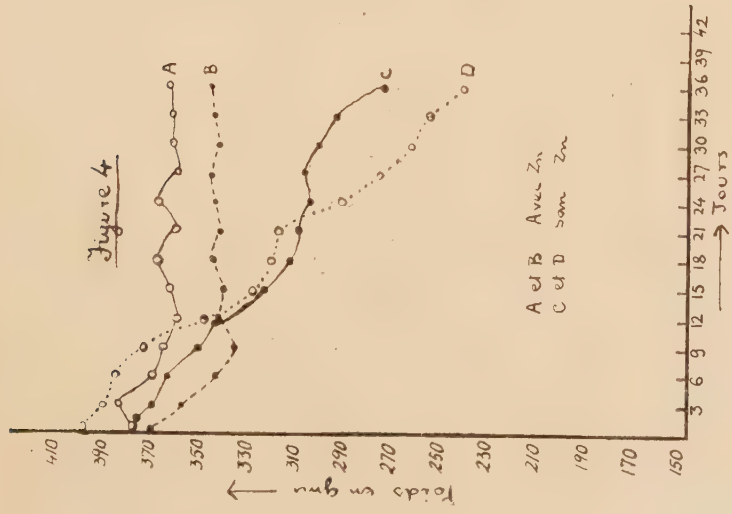
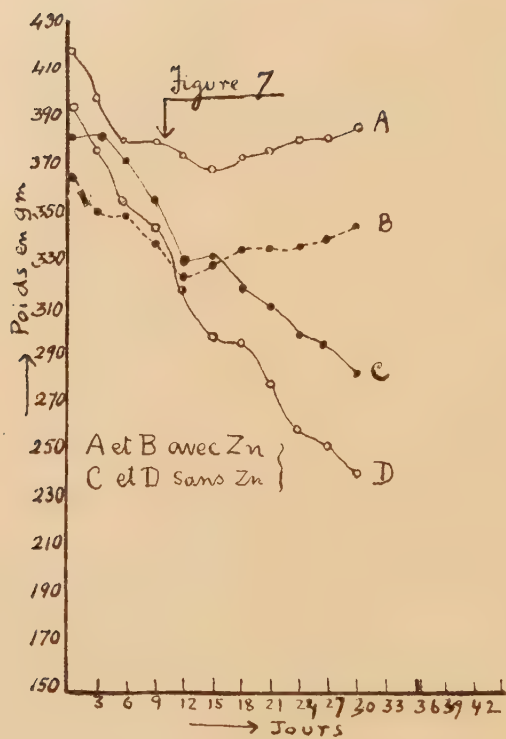


Figure 1.







INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. G. BERTRAND, *C. R. Acad. Sc.*, 1896, **122**, 1132.
2. G. BERTRAND et BENZON, *C. R. Acad. Sc.*, 1922, **175**, 289.
3. G. BERTRAND et BHATTACHARYA, *C. R. Acad. Sc.*, 1934, **198**, 1823.
4. BRAUN et BELLINGRODT, *Poggendorfs Annalen*, 1854, **92**, 175.
5. RAULIN, Thèse Doct. Sc., Paris, 1870.
6. COUPIN, *C. R. Acad. Sc.*, 1903, **136**, 392.
7. JAVILLIER, Thèse Doc. Sciences, Paris, 1908.
8. G. BERTRAND et JAVILLIER, *C. R. Acad. Sc.*, 1907, **145**, 924.
9. JAVILLIER, *Ann. Inst. Pasteur*, 1908, **72**, 720.
10. LEPIERRE, *C. R. Acad. Sc.*, 1913, **156**, 258, 409, 1179, 1489.
11. MAZÉ, *Ann. Inst. Pasteur*, 1914, **28**, 21.
12. DUFRÉNOY et REED, *Ann. agronom.*, 1934, **4**, 637.
REED et DUFRÉNOY, *C. R. Acad. Sc.*, 1934, **198**, 1535.
BARNETT et JONES, *Citrus Ind.*, 1934, **15** (12) 15.
BARNETT et WARNER, *Soil Sc.*, 1935, **39**, 145.
13. GHIGLIOTTO, *Ann. Fals. et Fraudes*, 1919, pp. 123-124.
14. DELEZENNE, *Ann. Inst. Pasteur*, 1919, **33**, 68.
15. G. BERTRAND et VLADESCO, *C. R. Acad. Sc.*, 1921, **172**, 698. — *Bull. Soc. Ch.*, 1922, **31**, 790, 268; 1923, **33**, 341.
16. G. BERTRAND et M^{lle} BEAUZEMONT, *C. R. Acad. Sc.*, 1930, **190**, 1089.
17. G. BERTRAND et VLADESCO, *Bull. Soc. Ch.*, 1922, **31**, 790.
18. MCHARGUE, *Am. J. Physiol.*, 1926, **77**, 245.
19. HUBBEL et MENDEL, *J. Biol. Ch.*, 1927, **75**, 567.
20. MCCOLLUM et NEWELL, *J. Nutrition*, 1933, **6**, 289.
21. STIRN, ELVEHJEM et HART, *Amer. J. Physiol.*, 1934, **107**, 146.
22. TODD, ELVEHJEM et HART, *J. Biol. Ch.*, 1935, **109**, 347.
22. HIBBARD, *Ind. Eng. Ch. (Anal.)*, 1933, **5**, 201.
23. HILL, *Ind. Eng. Ch. (Anal.)*, 1933, **5**, 201.
24. BOGG et ALBEN, *Ind. Eng. Chem. (Anal.)*, 1936, **8**, 97.
25. FALES et WARE, *J. Amer. Ch.*, 1919, **41**, 487.
26. CIMERMAN et WANGER, *Microchem.*, 1935, **18**, 53.
27. KINNERSLEY, O'BRIEN, PETER et READER, *Biochem. J.*, 1933, **27**, 225.
28. KINNERSLEY et PETER, *Biochem. J.*, 1928, **22**, 419.
29. CARTER, KINNERSLEY et PETER, *Biochem. J.*, 1930, **24**, 1832.
30. EICKMANN, *Arch. Trop. Schiff. Hyg.*, 1897, **1**, 268.
31. SCHAUHMANN, *Arch. Trop. Schiff. Hyg.*, 1914, **18**, 16, 18.
32. FUNK, *J. Physiol.*, 1914, **48**, 228.
33. WILLIAM et SEIDELL, *J. Biol. Ch.*, 1916, **26**, 431.

34. EMMETT et McKIM, *J. Biol. Ch.*, 1917, **32**, 409.
35. KELLAWAY, *Proc. Roy. Soc., Lond., B.*, 1921, **92**, 6.
36. PLIMMER et ROSEDALE, *Biochem. J.*, 1923, **17**, 725.
37. SEIDELL, *J. Biol. Ch.*, 1917, **29**, 145. — *J. Ind. Eng. Chem.*, 1921, **13**, 72. — *U. S. Pub. Health. Rep.*, 1922, **37**, 1519.
38. SEIDELL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1922, **8**, 746.
39. WILLIAM, *J. Biol. Ch.*, 1916, **25**, 43.
40. WILLIAM et WATERMAN, *J. Biol. Ch.*, 1928, **78**, 341.
41. WILLIAM et GUÉRIN, *J. Biol. Ch.*, 1930, **87**, 559.
42. SIMONET et RANDOIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1924, **6**, 601.
RANDOIN et LECOQ, *C. R. Acad. Sc.*, 1926, **182**, 1408.
43. CARTER et O'BRIEN, *Biochem. J.*, 1935, **29**, 2746.
44. O'BRIEN, *Biochem. J.*, 1934, **28**, 926.
45. BLOCK, COWGILL et KLOTZ, *J. Biol. Ch.*, 1932, **94**, 765.
46. DRUMMOND, *Biochem. J.*, 1918, **12**, 25.
47. NOVARO, *Pathologica*, 1920, **12**, 87, 133.
48. ABDERHALDEN, *Pfluegers. Arch.*, 1920, **178**, 260.
49. CRAMER, DREW et MOTTRAM, *Lancet*, 1921, II, 1202.
50. McCARRISON, *Studies in deficiency diseases*, London, 1921.
51. FARMER et RADENBAUGH, *Amer. J. Physiol.*, 1925-1926, **75**, 27.
52. DRUMMOND et MARRIAN, *Biochem. J.*, 1927, **21**, 834.
53. KON, *Biochem. J.*, 1927, **21**, 834.
54. DUTCHER, *J. Biol. Ch.*, 1918, **36**, 63.
55. FINDLAY, *J. Path. Bact.*, 1921, **29**, 175.
56. BIRCH, *Nature*, 1936, **138**, 27.
57. RAMOINO, *Pathologica*, 1916, **151**, 1.
58. ABDERHALDEN, *Pfluegers. Arch.*, 1923, **198**, 571.
59. DRUMMOND et MARRIAN, *Biochem. J.*, 1926, **20**, 1229.
60. ANDERSON et KULP, *J. Biol. Ch.*, 1922, **52**, 69.
61. GULICK, *Amer. J. Physiol.*, 1922, **59**, 483.
62. GULICK, *Amer. J. Physiol.*, 1924, **68**, 431.
63. FARMER et RADENBAUGH, *Amer. J. Physiol.*, 1925-26, **75**, 27.
64. GULVAO et CARDOSO, *Arch. Inst. Biol.*, 1930, **3**, 219.
65. ROCHE, *C. R. Acad. Sc.*, 1925, **180**, 467.
66. ABDERHALDEN, *Pfluegers Arch.*, 1922, **197**, 121.
67. HESS, *Amer. J. Med. Asson.*, 1921, **76**, 693.
68. HESS et MERSELER, *Hoppe-Seyl*, 1921, **119**, 176.
69. KOLLATH, *Klin. Wochenschr.*, 1929, **8**, 8444.
70. ABDERHALDEN et VLASSOPOULOS, *Pfluegers. Arch.*, 1930, **226**, 818.
71. PETER et GAVRILESCU, *Biochem. J.*, 1931, **25**, 1397.
72. FUNK, *J. Physiol.*, 1914, **47**, xxv.
73. FUNK et SCHONBORN, *J. Physiol.*, 1914, **48**, 328.
74. RANDOIN, *C. R. Acad. Sc.*, 1923, **177**, 498.
75. INAWASHIRO et HAYASAKA, *Tohoku. J. Exp. Med.*, 1928, **12**, 1.
76. HAYASAKA et INAWASHIRO, *Tohoku. J. Exp. Med.*, 1929-1930, **14**, 53.
77. COLLÁZO et MORELLIN, *J. Amer. Physiol.*, 1933, **33**, 1302.

78. KINNERSLEY et PETER, *Biochem. J.*, 1925, **19**, 820.
79. MEIKELJOHN, *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1310.
80. PETER et SINCLAIR, *Biochem. J.*, 1933, **27**, 1910.
81. PETER et THOMPSON, *Biochem. J.*, 1934, **28**, 916.
82. THOMPSON et JOHNSON, *Biochem. J.*, 1935, **29**, 694.
83. PETER, *Biochem. J.*, 1936, **30**, 2207.
84. SHERMAN et ELVEHJEM, *Biochem. J.*, 1936, **30**, 53.
85. SHERMAN et ELVEHJEM, *Amer. J. Physiol.*, 1936, **242**, 59.
86. WARBURG, *Biochem. Z.*, 1933, **259**, 492.
87. LOHMAN, *Naturwiss.*, 1937, **25**, 26.
88. STIRN et HOPER, *Science*, 1937, **85**, 482; voir aussi *Science*, 1937, **86**, 180.
89. GEWE, *Zeit. Physiol. Chem.*, 1936, **242**, 59.
90. WILLIAM et KLINE, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1936, **58**, 1504.
91. TODD et BERGEL, *J. Soc. Chem.*, 1936, 364.
92. G. BERTRAND, *Zeit. f. anorg. Ch.*, 1931, **47**, 920.
93. NEUBERG, *Biochem. Z.*, 1913, **58**, 158; *ibid.*, 1914, **64**, 251.
94. KOSTYCHEW, *Zeit. Physiol. Chem.*, 1920, **III**, 126-131.
95. COLLEY, *Amer. J. Bot.*, 1931, **18**, 266-287.
96. THUNBERG, *Kungl. Fysiograf Sallskapets une Sallskapets Forhandlingar*, Bd. **4**, Nr. 18, 1934.
97. THUNBERG, *Skandinavischen Archiv. f Physiol.*, 1934, **69**, 247, 254.
98. THUNBERG, *Lunds. Universitets A skriff*, N. F. Ard. 2, Bd. **30**.
99. JAVILLIER, *Ann. Inst. Pasteur*, 1908, **72**, 720; *C. R. Acad. Sc.*, 1912, **155**, 190; *Bull. Sc. Pharmacolog.*, 1914, **21**, 278.
100. REED et DUFRÉNOY, *Hilgardia*, 1935, **9**, 113.
101. REED et DUFRÉNOY, *Science*, 1935, **82**, 249.
102. WARBURG, *Biochem. Z.*, 1923, **142**, 325.
103. WARBURG, *Ueber den Stoffwechsel de Tumeren*, Berlin, Springer.
104. JOWETT, *Biochem. J.*, 1928, **22**, 717.
105. MEYERHOF et LOHMAN, *Biochem. Zeit.*, 1926, **171**, 425.
106. RYDIN, *Upsala Lakareforenings Forhandl.*, 1935-1936, **41**, 1-182.
107. RYDIN, *Chemical Abstracts.*, 1936, **30**, 1101.
108. SUIGARA et BENEDICT, *J. Biol. Ch.*, 1923, **55**, 33.
109. MARRIAN, BAKER, DRUMMOND et WOOLLARD, *Biochem. J.*, 1928, **21**, 1336.
110. CASE, *Biochem. J.*, 1932, **26**, 1532.
111. WARBURG, *Biochem. Zeit.*, 1924, **152**, 51.
112. RONA et DEUTSCH, *Klin. Wochsh.*, 1926, **5**, 1216.
113. MURPHY et HAWKINS, *J. Gen. Physiol.*, 1925, **8**, 115.
114. TODEMUNA, HODA et HOMMA, *Deutsch. Med. Woch.*, 1924, **50**, 105.
115. CORI et CORI, *J. Biol. Ch.*, 1925, **64**, 11; 1926, **65**, 397.
116. WARBURG, WIND et NAGELEIN, *Klin. Woch.*, 1926, **5**, 829.
117. CRISTOL, *C. R. Acad. Sc.*, 1922, **174**, 88.
118. BROOKS et JOWETT, *Biochem. J.*, 1928, **22**, 738.
119. G. BERTRAND, *C. R. Acad. Sc.*, 1914, **158**, 213.

- 120. DICKENS, *Biochem. J.*, 1935, **28**, 1468.
- 121. KISCH, *Biochem. Z.*, 1931, **255**, 31.
- 121. KREBS, *Ferment. Forschung*, 1935, **111**, 430.
- 123. ANDREICHEVA, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1934, **16**, 1730, 1756.
- 124. JAVILLIER, *Ann. Inst. Pasteur*, 1908, **72**, 720; Thèse, 1908, Paris.
- 125. MAXWELL, *Amer. J. Physiol.*, 1937, **168**, 316.
- 126. EMERY, *Amer. J. Physiol.*, 1937, **168**, 316.
 - EVANS et SIMPSON, *Proc. Soc. Exp. Biol. et Med.*, 1931, **28**, 845.
 - EVANS et SIMPSON, *Amer. J. Physiol.*, 1931, **89**, 381.
 - BISCHOFF, *Amer. J. Physiol.*, 1936, **116**, 239.
 - G. BERTRAND, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1935, **18**, 213.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Parachor

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 1^{er} décembre 1937

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris

G. ROUSSY.

